

# Metodeutvikling for deteksjon av Transmembranprotein 27 i serum med immunobasert LC-MS/MS

Line Buan



Masteroppgave ved Seksjon for farmasøytisk kjemi,  
Farmasøytisk Institutt,  
Matematisk-Naturvitenskapelig Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2015



# Metodeutvikling for deteksjon av Transmembranprotein 27 i serum med immunobasert LC-MS/MS

Line Buan

Masteroppgave ved Seksjon for farmasøytisk kjemi,  
Farmasøytisk Institutt,  
Matematisk-Naturvitenskapelig Fakultet

## **Veiledere:**

**Léon Reubsaet:** Professor ved avdeling for legemiddel- og bioanalyse,  
Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

**Trine Grønhaug Halvorsen:** Førsteamanuensis ved avdeling for  
legemiddel- og bioanalyse, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

**Milaim Pepaj:** PhD, forsker ved Hormonlaboratoriet, Oslo  
Universitetssykehus

© Line Buan

2015

Metodeutvikling for deteksjon av Transmembranprotein 27 i serum med immunbasert LC-MS/MS

<http://www.duo.uio.no/>

Forfatter: Line Buan

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Først og fremst ønsker jeg å berømme mine veiledere Trine, Léon og Milaim for deres kunnskap og positive vesen. Jeg vil også takke resten av de flinke og trivelige menneskene på avdeling for legemiddel- og bioanalyse; både for både faglige innspill og fredagskaker. Jeg setter pris på den lette tonen, og at det alltid har vært greit å spørre om faglige råd og bakgrunnsstoff, i tillegg til at dere vet hvor ting er gjemt, og ikke minst hvorfor i all verden det lekker fra purge-ventilen.

Lykke til videre til gjengen på masterkontoret! Det har vært godt å ha noen likesinnede rundt seg dette året.

Takk til det åpne miljøet i OSI klatring, som gjorde det mulig å kombinere et besøk til biblioteket i Stryn med en tur opp Nøtteliten.

Tusen takk til de kjære farmatøsene mine, for fem år med flotte, forskjellige folk, som fant sammen på farmasi.

Takk til familien min, som ikke synes noe mer eller mindre om meg for at jeg har skrevet en masteroppgave. Til slutt en kjempetakk til Alexander, som må være den snilleste og mest tålmodige jeg kjenner.

Line Buan

Mai 2015



# Sammendrag

Diabetes er en kronisk stoffskiftesykdom, som blant annet gir seg til uttrykk gjennom redusert  $\beta$ -cellefunksjon, og dermed høyt blodsukker. Komplikasjoner kan inkludere hjerte- og karsykdom, organsvikt, koma og tidlig død. Ved diagnosetidspunktet er ofte  $\beta$ -cellemassen betraktelig redusert. Dette er en irreversibel prosess, som det ikke eksisterer kliniske markører for i dag.

Transmembranprotein 27 (Tmem27) eksisterer i  $\beta$ -cellemembranen, og bidrar til regulering av  $\beta$ -cellens funksjon. Dette opphører når den ekstracellulære delen kløyves av med proteasen Bace2 og sendes ut i blodbanen, og den resterende delen brytes ned i cellen. Intakt eller intracellulær Tmem27 antas bare å eksistere i blodbanen som resultat av naturlig apoptose, eller skade. Ekstracellulær Tmem27 kan derfor fungere som markør for  $\beta$ -cellemasse, og intakt Tmem27 kan være markør for  $\beta$ -celleskade.

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en metode for deteksjon av ekstracellulær og intakt Tmem27.

Metoden er utviklet etter bottom-up-prinsippet. Prøveopparbeidelsen inkluderer immunoaffinitetseksentrasjon av Tmem27 fra serum, etterfulgt av trypsinspalting. Analyse utføres med væskeskromatografi-tandem massespektrometri (LC-MS/MS) og multiplere reaksjonsmonitorering (MRM), for disse m/z-overgangene:

Ekstracellulær Tmem27: 825,7  $\rightarrow$  708,1 og 1158,6.

Intakt Tmem27: 964,3  $\rightarrow$  1108,1 og 1368,4.

Ekstracellulær Tmem27 bekreftes med overgangen 825,7  $\rightarrow$  708,1 og 1158,6, samtidig som 964,3  $\rightarrow$  1108,1 og 1368,4 bekreftes som ikke tilstede. For intakt Tmem27 er det tilstrekkelig å bekrefte 964,3  $\rightarrow$  1108,1 og 1368,4.

I tillegg ble et intracellulært ion med m/z  $\sim$ 1008, men overgangene for dette ble ikke optimalisert for metoden.

# Forkortelser og begreper

ABC	Ammuniombikarbonat-buffer
ACN	Acetonitril
Bace2	Betasekretase2, protease som kløyver Tmem27 på tre mulige steder
BSA	Albumin fra bovint serum
C-peptid	Koblingspeptid
DTT	Ditiotretiol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrosprayionisering
eV	Elektronvolt
E-verdi	Expect value, sannsynligheten for å få et treff ved en tilfeldighet
FA	Formic acid, maursyre
HNF-1	Hepatocyttnukleærfaktor-1
IAA	Jodeddiksyre
in silico	Forsøk utført ved hjelp av datasimulering
in solution	Forsøk utført i tillaget prøveløsning
kDa	Kilodalton
LC	Liquid chromatography, væskechromatografi
LOD	Limit of detection, deteksjonsgrense
LTD	Lineær trippelkvadrupol
m/z	masse/ladning
MFA	Mobilfase A
MFB	Mobilfase B
MRM	Multiple reaction monitoring, multiplereaksjonsmonitorering
MS, MS1	Massespektrometri
MS/MS, MS2	Tandem massespektrometri
PBS	Fosfatbufret saltløsning
PTM	Posttranslatoriske modifikasjoner
QQQ	Trippelkvadrupol
s/n	Signal/Noise, signal/støy
Tmem27	Transmembranprotein27
Xcorr	Krysskorrelasjon



# Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn for oppgaven .....	1
1.2	Problemstilling.....	2
2	Teori .....	3
2.1	Proteomikk.....	3
2.1.1	Aminosyrer og proteiner .....	3
2.1.2	Biomarkører .....	4
2.2	Diabetes mellitus .....	4
2.2.1	Om sykdommen .....	4
2.2.2	Diagnostisering og markører.....	5
2.3	Transmembranprotein 27.....	7
2.3.1	Struktur.....	7
2.3.2	Funksjon i $\beta$ -celler.....	8
2.4	Prøveopparbeidelse.....	8
2.4.1	Serum som matrix .....	8
2.4.2	Immunoaffinitetsekstraksjon.....	9
2.4.3	Top-down og bottom-up.....	9
2.4.4	Trypsinklipping .....	10
2.5	LC-MS/MS av proteiner.....	11
2.5.1	Omvendtphase væskechromatografi.....	12
2.5.2	Elektrosprayionisering .....	12
2.5.3	Masseanalysator .....	14
2.6	Databehandling.....	17
2.6.1	In silico forsøk, med Proteome Prospector .....	17
2.6.2	Protein BLAST.....	17
3	Utstyr og kjemikalier.....	18
3.1	Hardware, software, maskiner og bruksutstyr .....	18
3.1.1	LTQ-Orbitrap .....	18
3.1.2	Ionefelle.....	18
3.1.3	Trippelkvadrupol.....	18
3.1.4	Andre maskiner .....	19

3.1.5	Bruksutstyr .....	19
3.2	Standarder og andre stoffer.....	20
3.2.1	Tmem27-IgG.....	20
3.2.2	Tmem27-GST.....	20
3.2.3	Antistoff til Tmem27.....	21
3.2.4	Øvrige stoffer .....	21
3.3	Løsninger .....	22
4	Metode.....	24
4.1	Tillaging av antistoffkoblede kuler.....	24
4.1.1	Klargjøring av magnetiske kuler .....	24
4.1.2	Koble antistoff til magnetiske kuler .....	24
4.2	Immunoaffinitetsekstraksjon .....	25
4.3	Trypsinklipping .....	26
4.3.1	Klipping av Tmem27 på magnetiske kuler .....	26
4.3.2	In solution klipping .....	26
4.4	MRM LC-MS/MS Trippelkvadrupol .....	27
5	Resultater og Diskusjon .....	29
5.1	In silico trypsinklipp.....	29
5.2	Valg av ekstracellulære signaturpeptider .....	31
5.3	Innledende optimalisering av kollisjonsenergi, og valg av fragmentioner.....	36
5.4	Kromatografi .....	37
5.5	Linearitet og deteksjonsgrense .....	38
5.6	Multippel reaksjonsmonitorering (MRM).....	39
5.6.1	Trippelkvadrupol (QqQ) .....	39
5.7	Valg av signaturpeptider for intakt Tmem27 .....	40
5.8	Immunoaffinitetsekstraksjon .....	42
5.9	Valg av standard .....	43
5.9.1	Valg av standard for Tmem27.....	43
5.10	Proteolytisk enzym.....	44
6	Konklusjon .....	46
7	Veien videre .....	47
	Litteraturliste .....	48
	Vedlegg .....	51





# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn for oppgaven

På Hormonlaboratoriet ved Oslo Universitetssykehus har det blitt fattet interesse for Transmembranprotein27 (Tmem27), som en potensiell biomarkør for diabetes. Studier ved Hormonlaboratoriet har vist at mengden Tmem27 i serum hos pasienter med autoimmun diabetes bare er 13 % sammenlignet med den hos friske individer (1). I tillegg har de vist at Tmem27 korrelerer positivt med koblingspeptid (C-peptid), som er en veletablert markør for insulinproduksjon, og dermed  $\beta$ -cellenes funksjon (1, 2). Ekstracellulær Tmem27 kløyves av Bace2, og kan vise seg å være en markør for  $\beta$ -cellemasse, mens intakt Tmem27 kan markere  $\beta$ -celleskade, som begge kan være svært nyttig for tidlig diagnose, og for å monitorere sykdomsutvikling og resultat av behandling (3, 4). På Hormonlaboratoriet har de målt verdier av Tmem27 i serum ved hjelp av enzymkoblet immunoabsorberende assay (ELISA), som ikke skiller på ekstracellulær og intakt Tmem27 (1). Dette kan være mulig ved hjelp av væskechromatografi tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Litteratursøk tyder på at det ikke eksisterer noen slik metode for Tmem27.

På Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo har forskningsgruppen Bioanalytics@UiO blant annet fordypet seg i analytisk proteomikk, og derunder utvikling av strategier og metoder til deteksjon av biomarkører til bruk i diagnostikk. Her bruker de gjerne spesifikk immunoaffinitetseksentrasjon i prøveopparbeidelsen, og kombinerer dette med LC-MS/MS, for å skille mellom ulike proteinformer, og oppnå LOD ned i pg/mL (5, 6).

Milaim Pepaj på Hormonlaboratoriet innledet dermed et samarbeid med Léon Reubsaet og Trine Grønhaug Halvorsen i Bioanalytics@UiO, og denne oppgaven er det foreløpige resultatet.



## 1.2 Problemstilling

Utvikle LC-MS/MS-metode for deteksjon av Tmem27 i serum, etter prøveopparbeidelse med immunoaffinitetsekstraksjon og enzymatisk spalting med trypsin.

Delmål:

1. Identifisere mulige signaturpeptider, for både ekstracellulær og intakt Tmem27.
2. Utvikle en LC-MS/MS-metode basert på MRM, med optimale m/z-verdier for signaturpeptider og fragmenter.
3. Utvikle en prøveopparbeidelsesmetode basert på kobling av antistoff for Tmem27 til magnetiske kuler, og bruke disse til immunoaffinitetsekstraksjon av Tmem27 fra serum.

## 2 Teori

### 2.1 Proteomikk

Proteomikk er læren om proteomet; alle proteinene som genomet uttrykker, inkludert postranslatoriske modifikasjoner (PTM) (7).

#### 2.1.1 Aminosyrer og proteiner

Proteiner er organiske makromolekyler av aminosyrer, som er satt sammen av en basisk aminogruppe ( $\text{NH}_2$ , N-terminal), en sur karboksylsyregruppe ( $\text{COOH}$ , C-terminal) og en organisk gruppe (R), som varierer (8). En liste over aminosyrer som finnes i humane proteiner kan ses i Tabell 1.

Aminosyre	Forkortelser	Polaritet	Andre relevante egenskaper
Alanin	A	Upolar	
Arginin	R	Positiv	Trypsin kløyver i C-terminal
Asparagin	N	Polar	Kan deamideres
Asparaginsyre	D	Negativ	
Cystein	C	Upolar	Kan danne disulfidbruer
Fenylalanin	F	Upolar	
Glutamin	Q	Polar	Kan deamideres
Glutaminsyre	E	Negativ	
Glycin	G	Upolar	
Histidin	H	Positiv	
Isoleucin	I	Upolar	
Leucin	L	Upolar	
Lysin	K	Positiv	Trypsin kløyver i C-terminal
Metionin	M	Upolar	Kan oksideres
Prolin	P	Upolar	Hindrer trypsinkløyving når foran R eller K
Serin	S	Polar	
Treonin	T	Polar	
Tryptofan	W	Upolar	
Tyrosin	Y	Polar	
Valin	V	Upolar	

Tabell 1 Oversikt over aminosyrer, med tilhørende forkortelser og relevante egenskaper. Tabell adaptert fra (8, 9).

Syre- og basegruppene kan lett lades i vandig væske. Aminosyrene kan kobles sammen til polypeptidkjeder via peptidbindinger, med rekkefølge gitt av genomet. Disse kjedene danner

proteinets primærstruktur, og ryggrad (8). Lokale buktninger i kjeden viser seg eksempelvis som  $\alpha$ -helixer og  $\beta$ -sheets, holdt på plass av ikke-kovalente bindinger i proteinets sekundærstruktur (8). Tertiærstrukturen er tredimensjonal, gjerne karakterisert med disulfidbruer mellom svovelgrupper i cystein (8). En eventuell kvarternærstruktur er tilstede i proteiner sammensatt av flere polypeptidkjeder (8). Når man beskriver proteiner begynner man med den N-terminale delen, og avslutter med den C-terminale (9). Proteiner er en variert gruppe makromolekyler, som utøver en rekke ulike funksjoner i kroppen, som insulinets glukoseomsetning (10). Mange kan også brukes som biomarkører (11).

### **2.1.2 Biomarkører**

National Institutes of Health har definert biomarkører som målbare indikatorer på normale biologiske prosesser, patogene prosesser, eller farmakologisk respons på terapeutisk intervensjon (11). Videre foreslår de at disse biomarkørene kan brukes til å stille diagnoser, karakterisere alvorlighetsgraden og utviklingen av tilstander, og monitorering av respons på behandling (11). Mange biomarkører er også proteiner, som i tilfellet Tmem27 (3, 11).

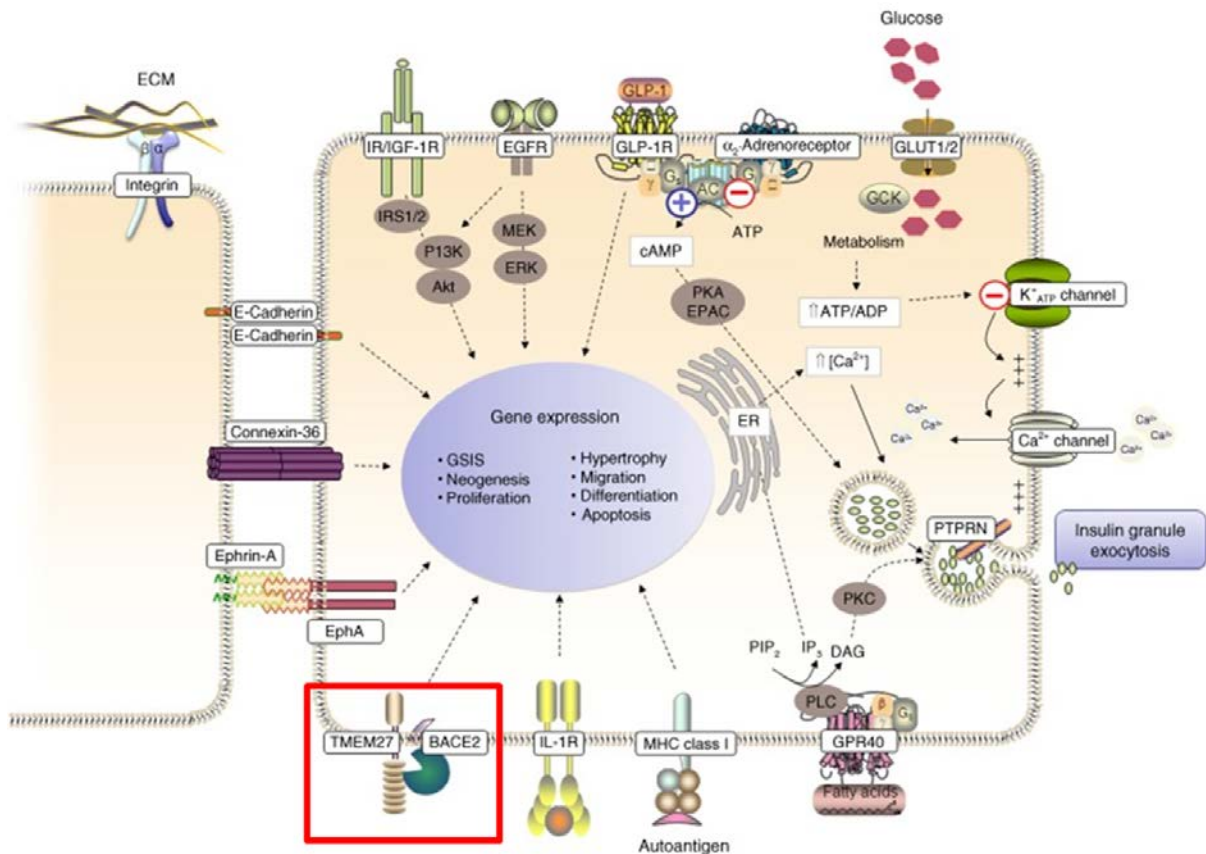
## **2.2 Diabetes mellitus**

### **2.2.1 Om sykdommen**

Diabetes mellitus er en samlebetegnelse på kroniske stoffskiftesykdommer. Den gir seg til uttrykk i form av kronisk hyperglykemi, og forstyrrelser i metabolismen av karbohydrater, fett og proteiner, som resultat av nedsatt insulinsekresjon eller insulinresistens (2, 12). Symptomer på diabetes inkluderer polyuri og tørste, vekttap, uklart syn og ketoacidose. Det siste kan i verste fall føre til koma og død. Langtidsvirkninger kan omfatte problemer hos en rekke organer, som sviktende syn, nyrer, nerver, hjerte- og kar, og sårtilheling (12). I Norge antas det at om lag 4 % av befolkningen har diabetes, og at et ukjent antall ikke vet at de er rammet (13). Man antar at omtrent 0,6 % av befolkningen i Norge har diabetes type 1, og 2,7 % behandles med medisiner for diabetes type 2. I tillegg kommer tilfeller av de med diabetes type 2 som ikke behandles med legemidler, og de udiagnostiserte (13).



Insulin utskilles utelukkende fra  $\beta$ -cellene i de Langerhanske øyer, som er den endokrine delen av bukspyttkjertelen (14). Figur 1 viser  $\beta$ -cellen med utvalgte mediatorer, som påvirker dens funksjoner.



Figur 1 Figur 1 Illustrasjon av  $\beta$ -cellen i bukspyttkjertelens Langerhanske øyer, med utvalgte membranproteiner involvert i cellens funksjoner. Innfelt nederst til venstre er Tmem27 med proteasen Bace2 (14).

Type 1 diabetes skyldes destruksjon av  $\beta$ -celler, mens type 2 skyldes  $\beta$ -celledestruksjon eller insulinresistens, eller en blanding av begge (15).

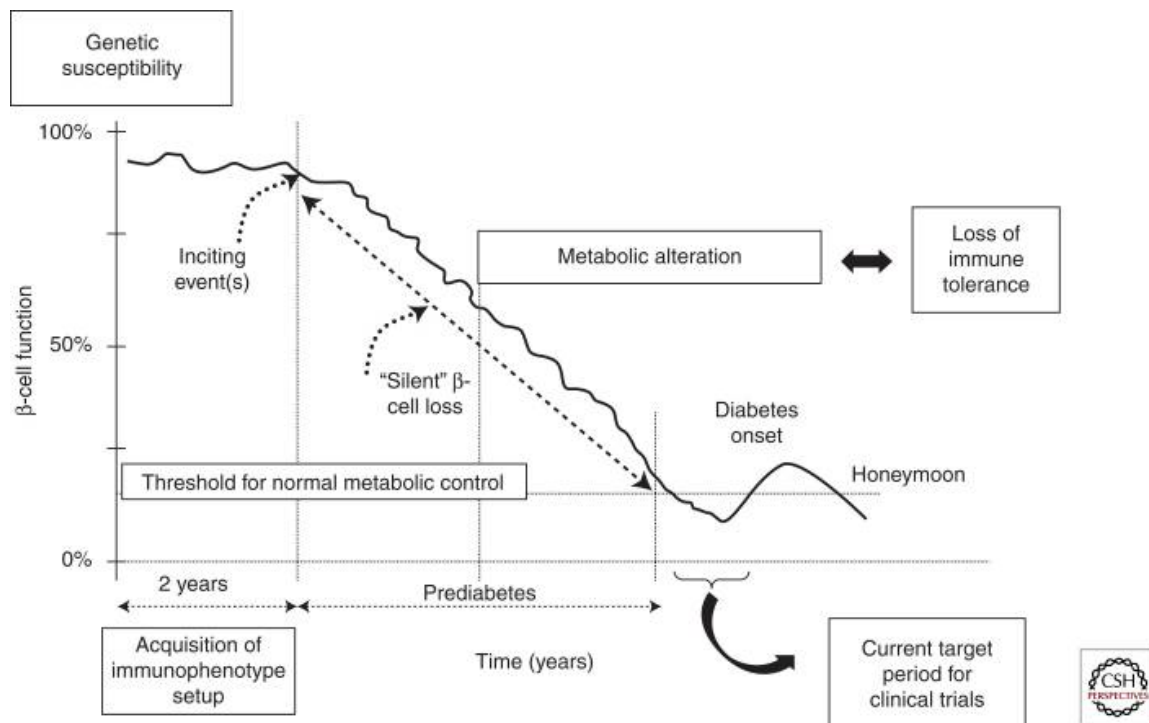
## 2.2.2 Diagnostisering og markører

Som nevnt er det mange som har udiagnostisert diabetes, og tidligere diagnose vil være fordelaktig med tanke på å få iverksatt behandling, som kan forsinke sykdomsutviklingen, og forebygge senkomplikasjoner (2). Dagens diagnostikk benytter seg i første omgang av blodsuktermålinger, og deretter eventuelle andre markører, som kan skille mellom ulike underkategorier, for best mulig tilpasset behandling (Tabell 2).

Markør	Hva som måles	Brukes til
<b>P-Glukose</b>	Blodglukose	Diagnostisering av diabetes
<b>B-Hb A1c</b>	Gjennomsnittsglukose, 6-8 uker	Mål på blodsukkerkontroll over tid
<b>C-peptid</b>	Egenproduksjon av insulin	Differensialdiagnoser
<b>Anti-GAD</b>	Antistoff mot $\beta$ -celleantigener	Høye verdier indikerer diabetes type 1
<b>IA-2</b>	Antistoff mot $\beta$ -celleantigene	Høye verdier indikerer diabetes type 1

Tabell 2 Oversikt over kliniske diabetesmarkører (2).

Dagens kliniske diabetesmarkører måler effekten av blodsukkerregulering, deriblant  $\beta$ -cellens funksjon, det vil si dens evne til å frigjøre hormonet insulin. En ulempe med dette er at homeostasen ofte kompenserer på måter som skjuler symptomene, samtidig som årsaken(e) får utvikle seg (Figur 2).



Figur 2 Graf som illustrerer  $\beta$ -cellefunksjon over tid, ved utvikling av diabetes.  $\beta$ -cellens funksjonalitet avtar under utviklingen av diabetes, men det kan ta flere år før symptomene er tydelige nok til å sette diagnose, da kroppen til en viss grad klarer å kompensere for funksjonstapet. Ødeleggelse av  $\beta$ -celler før diagnosetidspunktet betegnes som stille  $\beta$ -celletap (16).

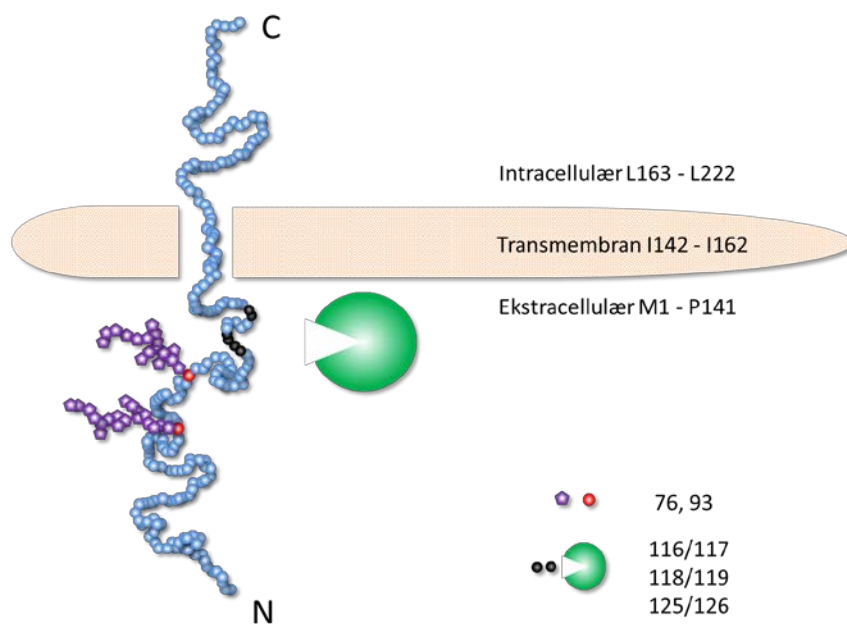
Etterhvert vil kroppens terskel for å opprettholde symptomkontroll overskrides, og sykdommen slår ut med symptomer. På dette tidspunktet har ofte ødeleggelsen av de insulinproduserende  $\beta$ -cellene pågått over flere år, og dette er ikke en reversibel prosess (16). Det er derfor et behov for markører som kan måle denne utviklingen. Det er ingen markører per i dag som kan måle  $\beta$ -cellemasse, eller destruksjon. Tmem27 antas å kunne utvikles som en spesifikk markør for dette (1, 17).

## 2.3 Transmembranprotein 27

Transmembranprotein 27 (Tmem27), også kalt Collectrin, er en homolog av angiotensinkonverterende enzym 2 (ACE2), og finnes både i nyrenes samlerør og i bukspyttkjertelens  $\beta$ -celler (3, 18).

### 2.3.1 Struktur

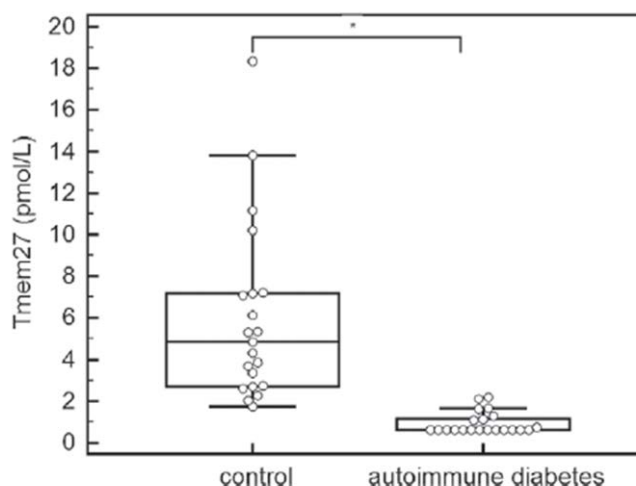
Tmem27 har en molekylvekt på ~46 kDa, og består av en aminosyresekvens på 222 aminosyrer, fordelt på ett ekstracellulært, ett transmembrant og ett intracellulært domene, se Figur 3 (3, 18, 19). Tmem27 danner homodimerer i cellemembranen ved hjelp av disulfidbindinger mellom svovelgrupper på aminosyren cystein, og er et N-linket glykoprotein, som glykosyleres på aminosyrene asparagin 76 og 93 (3). Den ekstracellulære N-terminalen til Tmem27 kan kløyves mellom aminosyrene F116/L117, L118/N119 eller F125/L126 av Bace2, en  $\beta$ -cellespesifikk protease, og frigis fra plasmamembranen til blodomløpet (3). Etter kløyving gjenstår en ekstracellulær, N-terminal del på ~ 25 kDa, som er fri i blodbanen, og en C-terminal del på 22 kDa, som blir igjen i cellen og degraderes (3). Tmem27 kløyves ikke av Bace2 når den eksisterer som homodimerer, eller deglykosyleres (20).



Figur 3 Transmembranprotein 27. Tmem27 består av 222 aminosyrer på 46 kDa. N-terminal, ekstracellulær del på 25 kDa kan spaltes av med proteasen Bace2. Glykosylering kan forekomme på N76 og N93.

### 2.3.2 Funksjon i $\beta$ -celler

Intakt, ukløyyvet, Tmem27 stimulerer til  $\beta$ -celledeling og økt masse av langerhanske øyer, og man finner redusert forekomst av Tmem27 ved diabetes, som vist i Figur 4 (1, 3). Intakt Tmem27 er et målprotein for HNF-1, og øker utskillelse av insulin via eksocytose (21). Det er forløpig ikke noe som tyder på at Tmem27 utøver noen funksjon i etterkant av Bace2-kløyving; hverken C-terminal del i cellen, eller avkløyyvet N-terminal del i blodomløpet.



Figur 4 Resultater av ELISA-målinger av Tmem27 i serum hos friske frivillige og personer med autoimmun diabetes (1).

Ekstracellulær Tmem27 antas å finnes i blodomløpet i takt med Bace2-kløyving, mens intakt Tmem27 bare vil forekomme i blod ved naturlig apoptose, eller skade (4). Det antas derfor at ekstracellulær Tmem27 kan brukes som markør for  $\beta$ -cellemasse, og at intakt Tmem27 kan brukes som markør for  $\beta$ -celleskade (1).

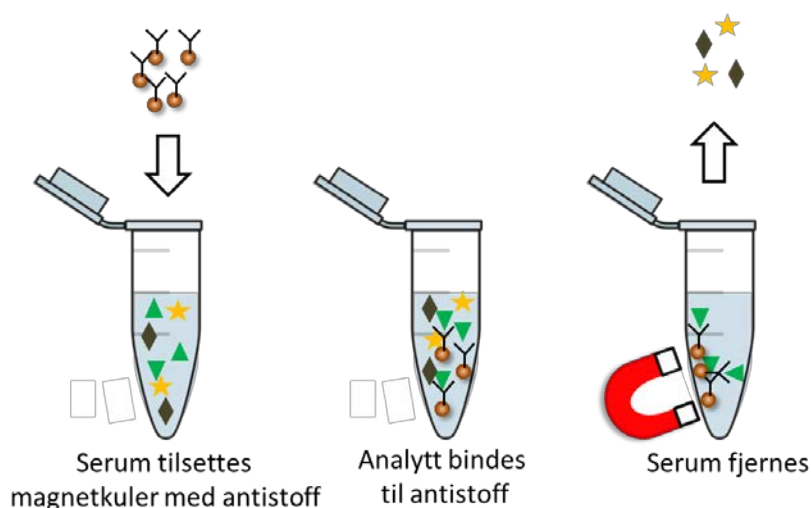
## 2.4 Prøveopparbeidelse

### 2.4.1 Serum som matrix

Serum er en komplisert biologisk matrix, hovedsakelig bestående av en NaCl-løsning med proteiner. Serum lages av koagulert fullblod, som sentrifugeres, slik at blodcellene kan fjernes (22). På grunn av alle de store proteinene i serum er det fordelaktig å rense opp prøven før den injiseres på separasjonskolonnen, for å hindre at den går tett, men varer lenger. I denne oppgaven løses dette med immunoaffinitetsekstraksjon.

### 2.4.2 Immunoaffinitetsekstraksjon

Immunoaffinitet er en betegnelse på de spesifikke, komplimentære interaksjonene og tredimensjonale strukturene som binder antistoff og antigen sammen til et kompleks (8). Immunoaffinitetsekstraksjon utnytter dette til å isolere bestemte målproteiner, eller antigener, ved hjelp av antistoff som er spesifikke for målproteinene (7). For å isolere antistoff/antigen-komplekset fra resten av prøven kan antistoffet festes til magnetiske kuler og holdes på plass av en magnet, mens resten av prøveløsningen pipetteres vekk, som vist i Figur 5 (5, 23). I ELISA-plater er antistoffet gjerne koblet direkte til veggen av brønnene, og den overflødige prøveløsningen kan vaskes vekk (1, 24). For å skille målproteinene fra magnetkulene eller brønnveggen kan det enten elueres av med et elueringsmiddel som er sterkt nok til å bryte interaksjonene, eller klippes opp med et enzym.



Figur 5 Illustrasjon av ekstraksjon ved hjelp av immuniserte magnetkuler. En serumprøve med blant annet målproteinene tilsettes magnetkuler koblet med antistoff, som er spesifikt for målproteinene. Målproteinene vil danne et kompleks med antistoffet på magnetkulene. Dette komplekset vil kunne holdes igjen i prøverøret ved hjelp av en magnet, mens resten av serumet pipetteres vekk.

### 2.4.3 Top-down og bottom-up

Analyse av proteiner skjer i økende grad ved hjelp av tandem-MS, og to hovedstrategier er top-down og bottom-up (7, 25, 26).

I top-down introduseres intakte proteiner til MS-systemet, hvor de fragmenteres, og massene til både proteinet og fragmentene utnyttes til identifikasjon (26). Fordeler med top-down inkluderer større dekning av aminosyresekvensen, bedre karakterisering av glykosyleringer,

og andre posttranslatoriske modifikasjoner (PTM), samt høyere sikkerhet av kvantifisering (26). Samtidig krever top-down analyseinstrumenter med høy oppløsning og nøyaktighet, som orbitrap, for å skille eventuelle koeluenten (26).

I bottom-up spaltes proteinet til peptider ved hjelp av proteaser, før de injiseres i MS-systemet (7, 26). Det ideelle for MS-analyser er peptider på 6-20 aminosyrer, da færre gir dårlig spesifisitet for proteinet, og lengre gir vanskeligheter med tandem MS-analyseringen (7).

Fordelene med bottom-up er høy sensitivitet og mulighet for å identifisere peptider i kompliserte prøver (26). Ulempene kan være at man ikke nødvendigvis kan si med sikkerhet at hele sekvensen er tilstede, og at PTMs kan gå tapt (26). I denne oppgaven er det bottom-up som brukes, med trypsin som protease.

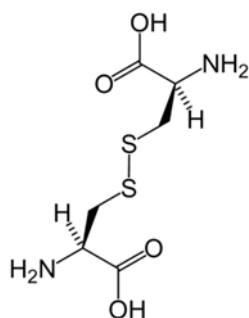
Enzym	C-terminal kløyving	N-terminal kløyving	Kontraindusert
Trypsin	/K-, /R-		/P
Chymotrypsin	/W-, /Y-, /F-		/P
Glu C	/E-, /D-*		/P
Lys C	/K-,		/P
Asp N		/D-	

Tabell 3 Liste over noen ulike proteaser med spesifikk kløyving, adaptert fra Liebler (7). Proteasene som kløyver C-terminalt får ikke kløyvet dersom aminosyren som det vanligvis kløyves etter etterfølges av Prolin C-terminalt. \*Kløyver etter asparaginsyre og glutaminsyre i natriumfosfatbuffer; ellers bare etter glutaminsyre.

#### 2.4.4 Trypsinklipping

Trypsin spalter peptidbindinger mellom aminosyrer i C-terminal ende av arginin og lysin, med mindre de er etterfulgt av prolin C-terminalt, noe som ofte gir gode lengder på peptidene (7). Disse tryptiske peptidene navngis fra N-terminalen, T1, T2, T3 og så videre.

Fullstendig spalting er viktig for å få høyest mulig utbytte av analysene (7). Proteiner som inneholder cystein kan danne sterke, kovalente disulfidbindinger, som kveiler proteinet slik at det kan bli fysisk vanskelig for trypsin å komme til, og dermed øke sannsynligheten for «missed cleavages» (7). Missed cleavage er en betegnelse på peptider med ufullstendig spalting av trypsin, og som kjennetegnes ved at de har arginin og lysin inni sekvensen, og ikke utelukkende C-terminalt. For å tilgjengeliggjøre spaltningsstedene reduseres disulfidbindingene på svovelgruppene til aminosyrene cystein med ditiotretiol (DTT) (Figur 6).



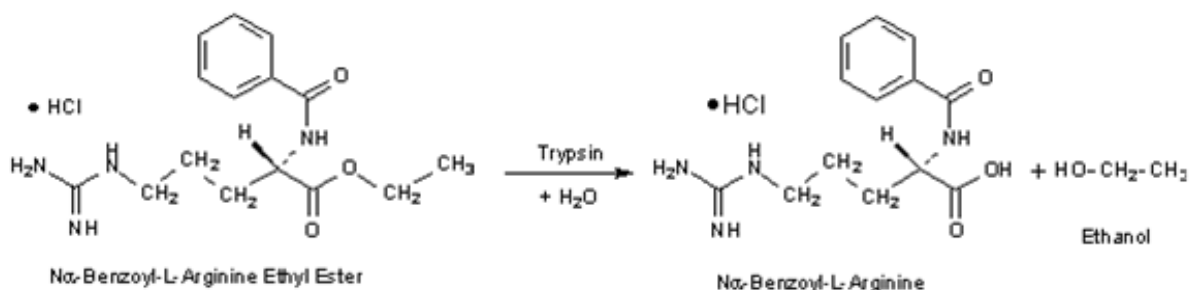
Figur 6 Illustrasjon av disulfidbru mellom to cysteinaminosyrer. Disse kan spaltes med en reduseringsagent, som for eksempel DTT.

For å hindre de reduserte svovelgruppene fra å gjendanne bindingene, alkyleres de ved hjelp av jodeddiksyre (IAA) (Figur 7).



Figur 7 Illustrasjon av alkylering av redusert cystein med IAA.

Trypsin tilsettes i et overskudd til proteinmengden, for å bidra til mer omfattende klipping (Figur 8).

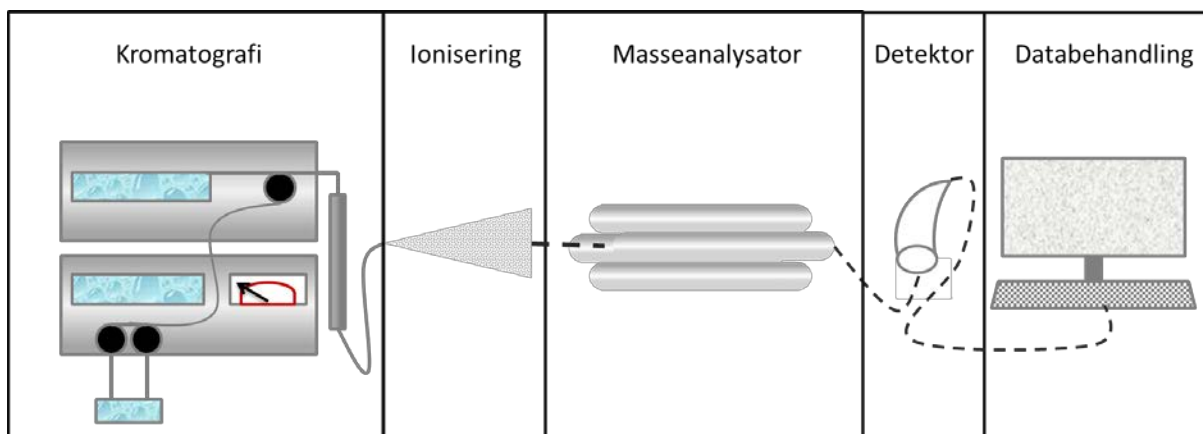


Figur 8 Illustrasjon av spalting av peptidbindinger ved hjelp av trypsin (27).

Etter spaltingen kan reaksjonen eventuelt stanses med maursyre (FA).

## 2.5 LC-MS/MS av proteiner

LC-MS/MS er en sammensatt analyseinstrumentering bestående av væskekromatografi og tandem massespektrometri. Først separeres prøveblandingen mekanisk i en LC- kolonne, og etter hvert som stoffene eluerer ut av kolonna føres de inn i MS-systemet, hvor de analyseres på bakgrunn av deres masse/ladnings-forhold ( $m/z$ ) (28).



Figur 9 Generell oversikt over komponenter i LC-MS/MS. Prøveløsningen separeres ved hjelp av væskerkromatografi, ioniseres, analyseres på bakgrunn av  $m/z$  i masseanalysator og detekteres, før resultatene bearbejdes i en datamaskin.

### 2.5.1 Omvendtfase væskerkromatografi

I omvendt-fase-væskerkromatografi (LC) er stoffene man vil analysere løst i en vandig mobilfase, og stasjonærfasen er hydrofobe partikler i en kolonne. Hydrofobe interaksjoner, som van der Waals-krefter, mellom analyttene i mobilfasen og stasjonærfasen bidrar til retensjon av analyttene, slik at de mest hydrofile stoffene vil eluere først, og dermed separerer stoffene (28).

Mobilfasene som brukes i forbindelse med MS bør være flyktige, for eksempel acetonitril (ACN) eller maursyre (FA), for at de ikke skal ligge igjen som forurensninger og forårsake skade på maskinen. I tillegg bør de ha en pH som holder analyttene ladet, for å få bedre ionisering av ESI (28). Fordi peptider inneholder både basiske sidegrupper, i tillegg til aminogruppen i N-terminalen, kan det være en fordel med sur pH for god kromatografi av proteiner (7).

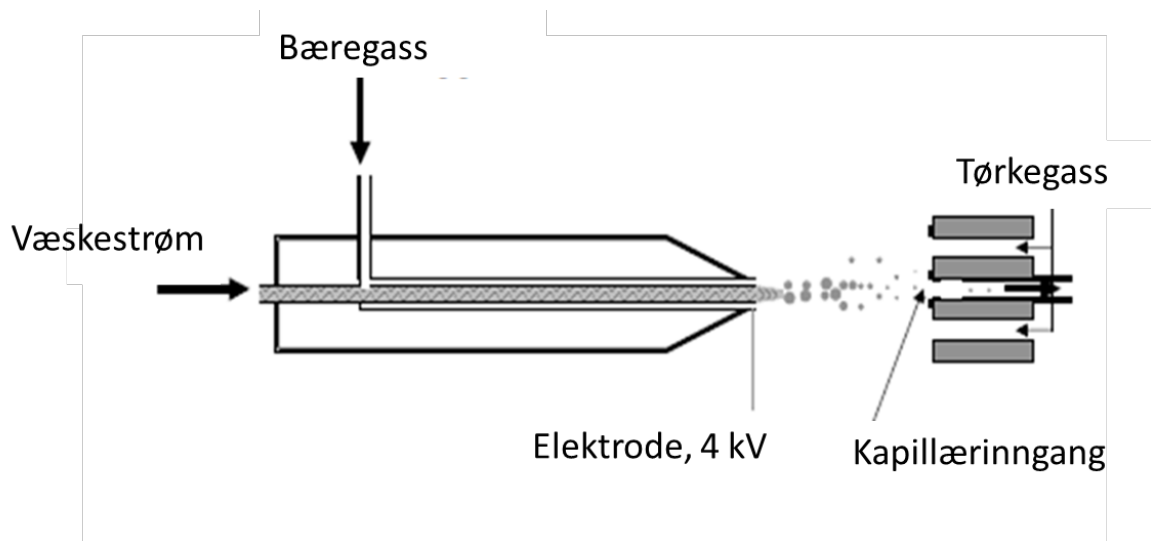
LC-systemet består av en autosampler til prøveuttak, pumper som pumper mobilfasene, en injektor og en separasjonskolonne.

### 2.5.2 Elektrosprayionisering

I et massespektrometer bestemmes masse-over-ladning ( $m/z$ ), så for å sørge for ladning, og dermed en analyseverdi, må stoffene være ioniserte. Elektrosprayionisering (ESI) er en såkalt



myk ioniseringsteknikk i atmosfærisk trykk, som brukes på sure og basiske stoffer, og derfor egner seg godt for analyse av proteiner og peptider (Figur 10).

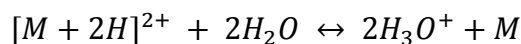
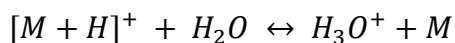


Figur 10 Elektrosprayionisasjon. Eluentene fra LC-kolonna føres inn i et trangt rør med  $N_2$  bæregass, og høy spenning. Ved utgangen av røret forstøves væskeblandingen ved hjelp av  $N_2$  til små dråper. Disse dråpene får elektrisk ladning av spenningen mellom elektroden ved rørråpningen og inngangen på kapillæret til masseanalysatoren (Spenning på 2-5 kV). På grunn av ladningen vil analyttene føres til masseanalysatoren, ved hjelp av den elektriske spenningen. Væskekomponentene uten ionisering vil fordampe, spyles vekk av  $N_2$  tørkegass og pumpes ut via en vakuumpumpe.

ESI krever at analyttene er på ionisert form allerede fra LC-kolonna, og ved hjelp av pH-justering av mobilfasene lar dette seg kontrollere for peptider. De svake basene i aminogruppene på N-terminalen, og på histidin, får positiv ionisering ved pH lavere enn 7,0, og nitrogengruppene på lysin og arginin ioniseres under pH 8,5. Karboksylsyrene i C-terminalen av peptidene er uladet ved pH under 3,0, og negativt ladet ved pH over 5,0. Altså vil sur pH under pH 3,5 gi netto positiv ladning (7). For peptider er det fordelaktig med sur pH for god kromatografi av peptider, og fordi positive ladninger gir bedre fragmentering (7). På grunn av dette bør ioniseringen skje i positiv modus.

Ionene som dannes er for det meste molekylioner, se ligning under (28). Fordi ESI ioniserer på bakgrunn av ioniserbare syre-/basegrupper, kan peptider med flere slike grupper få flere ladninger i løsning. Dette gjelder spesielt for peptider klippet til med trypsin, da de i tillegg til den basiske aminogruppen i N-terminalen har basiske arginin eller lysin plassert C-terminalt (7).

Ligning for ionisering av basiske stoffer ved  $\text{pH} < \text{pK}_a$ :

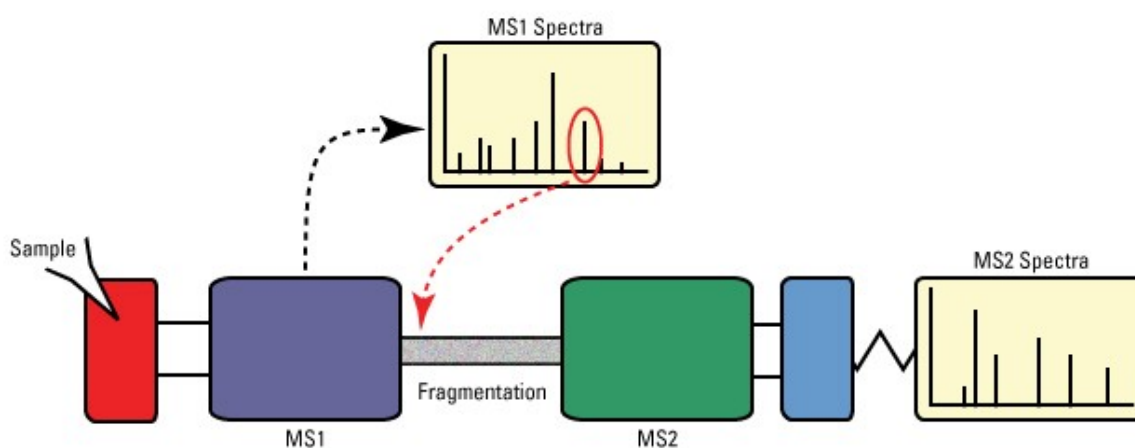


De basiske gruppene (her M for molekyl) vil ta til seg hydrogenioner ( $H^+$ ) fra det sure miljøet ( $H_3O^+$ ) og danne positivt ladede molekyllioner ( $[M + H]^+$ ), med en eller flere positive ladninger.

### 2.5.3 Masseanalysator

Masseanalysatoren selekterer ioner etter eksakte masser, ved hjelp av forholdet mellom masse og ladning ( $m/z$ ), ved at de akselereres og deflekteres ulikt av elektrostatiske felt (28). Ioner med liten  $m/z$ -verdi bøyes mest av, og høyere spenning på feltet gir også kraftigere avbøyning. For å hindre ionene i å kollideres med luftmolekyler, og ikke når frem til detektoren, skjer dette under nær vakuum, som lages ved at en pumpe pumper ut luften (28).

En Faradaydetektor registrerer antall ioner med de forskjellige massene, og sender informasjonen til en datamaskin med software som kan behandle dataene til å danne massespektre (Figur 11)(28).



Figur 11 Skjematisk fremstilling av generering av massespektre, MS1 og MS2 (29).

## Massespektrometri, MS1

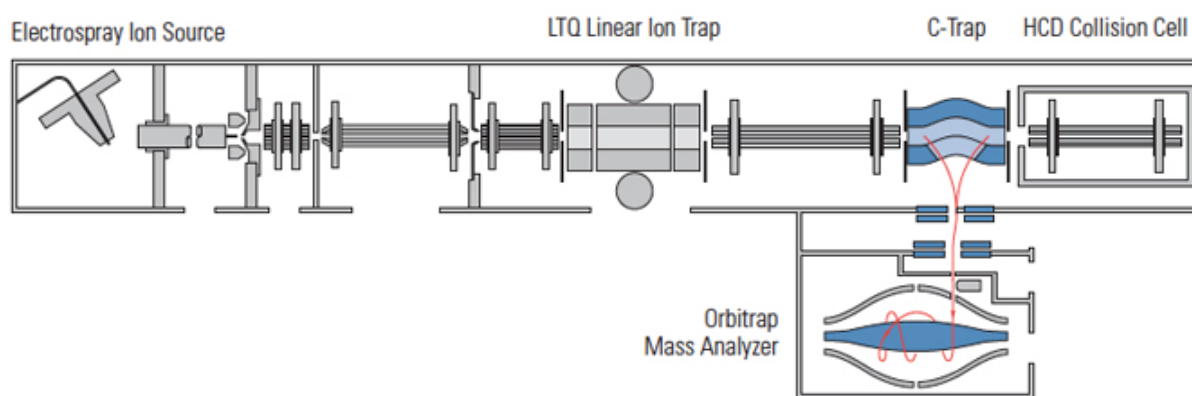
Resultatet fra analysering med masseanalysator vises som et massespekter (MS1), med ionemengden plottet som topper over tid. Høye topper indikerer at mange ioner ble analysert på det tidspunktet. Det er mulig å se på bestemte ioner i spekteret, ved å gjøre uttrekk av disse ionenes  $m/z$ -verdi.

## Tandem massespektrometri, MS2, MS/MS

For å oppnå mer følsom analyse, for lavere konsentrasjoner, kan tandem massespektrometri benyttes. Her gjennomgår ionene fra MS1 en fragmentering, som spalter ionene til mindre deler, og deretter analyseres. Den samlede informasjonen av MS1 og MS2 gir grunnlag for svært nøyaktig bestemmelse av stoffer.

## Orbitrap

I orbitrap injiseres ionene med høy fartsenergi i et kammer, som inneholder en spindel med høy spenning (Figur 12). Kombinasjonen av spenningen på spindelen, og den høye fartsenergien til ionene, sender dem i bane rundt spindelen, basert på  $m/z$ -verdien. Systemet kan stilles inn til å sende molekylioner med bestemt  $m/z$  til detektor (30). Systemet benyttet i denne oppgaven er en kombinasjon av orbitrap med en lineær ione-felle (Figur 12).



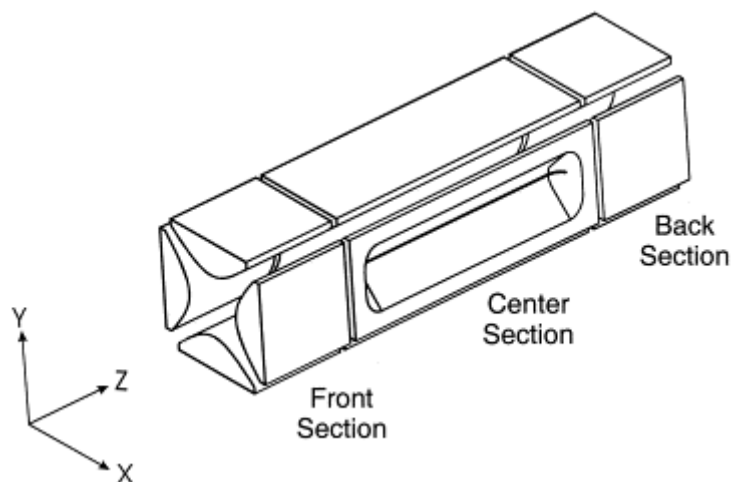
Figur 12 Skjematisk fremstilling av LTQ-Orbitrap med lineær ione-felle (31).

Orbitrap gir høy oppløsning og nøyaktighet, og egner seg derfor godt til opptak av hele spektre med mye datainformasjon, som fullscan og datadependent (30, 32). Datadependent veksler mellom å ta opp fullstendige MS1-spektre, og MS2-spektre av de høyeste toppene fra MS1 (33). Dette er en godt egnet måte å undersøke store datamengder med ukjent innhold på.

Den har derimot noe lavere sensitivitet, og tidkrevende analyse, sammenlignet med trippelkvadrupol (30, 32).

### Lineær ionefelle

Prinsippet til ionefeller er at de fanger ioner ved hjelp av elektroder, som sender dem i en bestemt bane basert på  $m/z$ -verdien (34). Ionene sendes samlet til detektoren i flere omganger (7). Figur 13 viser en skjematisk fremstilling av en lineær ionefelle.

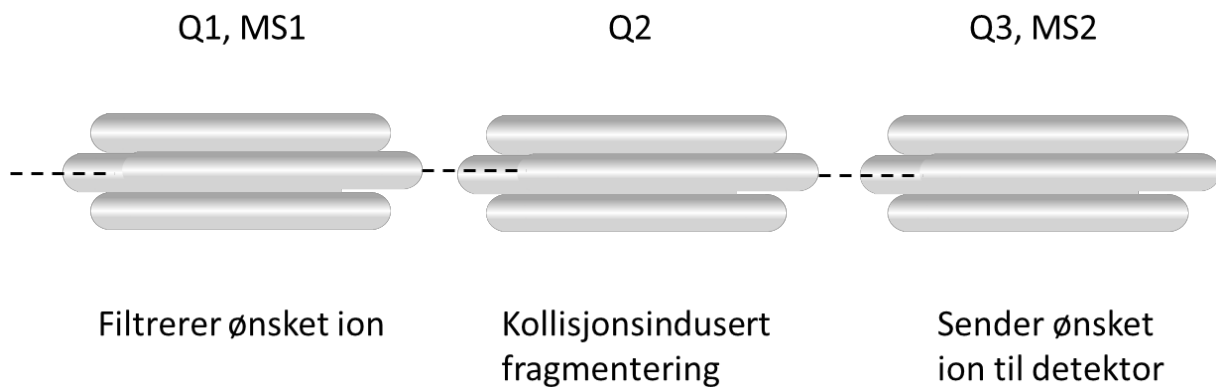


Figur 13 Skjematisk fremstilling av en lineær ionefelle. Fire elektroder omringer rommet ionene sendes gjennom. Ved å endre spenningen på elektrodene kontrolleres banen til ionene, basert på deres  $m/z$ -verdi (34).

Fordi ionene samles opp, isteden for å sendes kontinuerlig til detektoren, vil en stor andel treffe detektoren, som gir apparatet høy følsomhet (28). Lineære ionefeller har større kapasitet til å samle ioner enn kammer-feller (34). De er raske og fleksible, og gir god fragmentering, men har relativt lav nøyaktighet og oppløsning, sammenlignet med for eksempel orbitrap.

### Trippelkvadrupol (QqQ)

Kvadrupolprinsippet bygger på at ionene oscillerer mellom fire parallelle stenger med justerbare elektriske felter (28). Disse kan stilles inn slik at bestemte  $m/z$ -verdier går videre, mens resten blir forkastet. I enkle kvadrupolsystemer går ionene direkte til detektoren. Figur 14 viser en trippelkvadrupol (QqQ), bestående av tre kvadrupoler i serie (Q1-Q3). Q2 utsetter molekyllionene for kollisjoner med inerte gasser, som argon, som gir fragmentering til mindre biter. Q3 filtrerer ut fragmenter med spesifikke  $m/z$ -verdier, slik at de når frem til detektoren (28).



Figur 14 Skjematisk fremstilling av et QqQ-system.

QqQ har høy sensitivitet, og egner seg godt til multippel reaksjonsmonitorering (MRM) da de kan oppnå god signal/støy-ratio (S/N) (30). I MRM analyseres flere ioner med flere fragmentoverganger.

## 2.6 Databehandling

Etter at prøvene har gjennomgått analyse må dataene bearbeides.

### 2.6.1 In silico forsøk, med Proteome Prospector

In silico forsøk er datasimuleringer av virkeligheten. I Proteome Prospector kan man blant annet simulere trypsinklipping av aminosyresekvenser, og hvordan disse peptidene igjen kan spaltes videre til fragmenter. Hvis man ønsker kan man inkludere modifikasjoner i søket, som oksidering, eller karboksylgrupper (35).

### 2.6.2 Protein BLAST

Protein BLAST er en søkemotor, som blant annet kobler aminosyresekvenser opp mot databaser over proteiner, og ser etter hvilke proteiner som gir best treff for aminosyrene. Treffsikkerheten uttrykkes som en E-verdi (Expect value, forventningsverdi). Denne sier noe om sjansen for å finne sekvensen i databasen ved en tilfeldighet, og en lav E-verdi tilsvarer et godt treff. I denne oppgaven brukes Protein BLAST med database Swiss-Prot, for å undersøke om de tryptiske peptidene er spesifikke for Tmem27, eller om aminosyresekvensen også kan finnes i andre proteiner (36).

## 3 Utstyr og kjemikalier

### 3.1 Hardware, software, maskiner og bruksutstyr

#### 3.1.1 LTQ-Orbitrap

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler	WPS-3000TRS	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Kolonne	BioBasic-8, Dimensjoner: 50mm x 1 mm, Partikkelstørrelse: 5 µm, Porestørrelse: 300 Å	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Loadingpumpe	Ultimate ISO-3100SD Standard Isocratic Pump	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Mikropumpe	LPG-3400M	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Masseanalysator	LTQ Orbitrap Discovery	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Programvare	Chromeleon Client, version 6.80 Thermo Xcalibur 2.0.7 Proteome Discoverer 1.4	Dionex corporation, Sunnyvale, USA Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA (begge)

#### 3.1.2 Ionefelle

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler	WPS-3000TSL	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Kolonne	Se LTQ-Orbitrap	
Pumpe	LPG 3300	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Degasser	SOR-100	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Programvare	Chromeleon 6.80 Thermo Xcalibur 2.1	Dionex corporation, Sunnyvale, USA Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA.

#### 3.1.3 Trippelkvadrupol

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler	WPS-3000TRS	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Kolonne	Se LTQ-Orbitrap	
Pumpe	LPG-3400M	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland
Flow manager	FLM-3300	Dionex Softron GmbH, Germering, Tyskland

Masseanalysator	TSQ Quantum Access	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Programvare	Chromeleon 6.80 Thermo Xcalibur 2.2	Dionex corporation, Sunnyvale, USA Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

### 3.1.4 Andre maskiner

Utstyr	Modell	Leverandør
Prøveblander med inkubator	Thermomixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Prøveblander	HulaMixer® Sample Mixer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Vortexmikser	MS 3 digital	IKA Works Inc., Wilmington, USA
Sentrifuge	Galaxy Mini Centrifuge	VWR International, Leuven, Belgia
Inkubatorskap	ED 53	BINDER Inc, Bohemia, USA
Analysevekt	XS205 DualRange, veiegrense: 81 g (fin)-220 g leselighet: d = 0,01 mg / 0,1 mg	Mettler-Toledo, Greifensee, Sveits
Vannanlegg for ionebyttet vann	MilliQ Centry Systems, integral 3	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
pH-meter	744 pH-meter	Metrohm AG, Herisau, Sveits

### 3.1.5 Bruksutstyr

Utstyr	Modell	Leverandør
Automatpipetter	Biohit: 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL Thermo electron corporation: 4500 V6 8933 1-5 mL	Biohit Oyj, Helsinki, Finland Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pipettespisser	Biohit Optifit Tip: 10 µL, 200 µL, 1000 µL Thermo Fisher Scientific Finntip: 5 mL, volume range 0,5-5 mL	Biohit Oyj, Helsinki, Finland Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Eppendorfrør	Protein LoBind Tube: 1,5 mL, 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Sentrifugerør	Ultra High Performance VWR 15 mL	VWR International, Leuven, Belgia
Vialer	32 x 11,6 mm	Nerliens Meszansky, Oslo, Norge
Vialkorker	Passer til vialer 32 x 11,6 mm	Nerliens Meszansky, Oslo, Norge
Inserts til vialer	Micro-insert 0,1 mL	VWR International, Leuven, Belgia
Magnetstativ	DynaMag-2	Invitrogen, Carlsbad, USA
Magnetkuler	Dynabeads® M-280 tosylactivated	Invitrogen, Carlsbad, USA

## 3.2 Standarder og andre stoffer

### 3.2.1 Tmem27-IgG

Stoff	Kvalitet	Leverandør
Recombinant Human Collectrin Fc Chimera	> 95 %,	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA.

Tmem27-IgG er en rekombinant standard av den ekstracellulære delen av Tmem27. Fra N-terminal til C-terminal er den satt sammen av: **Humant Collectrin** (Tmem27) (E15-P141), **spacer** (IEGRMD), **Human IgG<sub>1</sub>** (P100-K330). Kombinert blir aminosyresekvensen som følger:

ELCQPGAENAFKVRLSIRTALGDKAYAWDTNEEYLFKAMVAFSMRKVPNREATEIS  
HVLLCNVTQRVSFWFVVTDPKSNHTLPAVEVQSAIRMNKNRINNAFFLNDQTLEFLK  
IPSTLAPPMDPSVP**IEGRMD**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

### 3.2.2 Tmem27-GST

Stoff	Kvalitet	Leverandør
Transmembrane Protein 27 (TMEM27) (full length) protein (GST tag)	-	antibodies-online GmbH, Aachen, Tyskland.

Tmem27-GST er en rekombinant standard av den fulle aminosyresekvensen til **Tmem27**, N-terminalt koblet til en **GST-tag**. Dette er den fulle sekvensen til standarden:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHL YERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY  
YIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF  
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL  
DAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPG  
IHRD**MLWLLFFLVTAIHAE**LCQPGAENAFKVRLSIRTALGDKAYAWDTNEEYLFKA



MVAFSMRKVPNREATEISHVLLCNVTQRVSFWFVVTDP SKNHTLP AVEVQSAIRMN  
 KNRINNAFFLNDQTLEFLKIPSTLAPPMDPSVPIWIIIFGVIFCIIV AIALLLSGIWQRRR  
 KNKEPSEVDDAEDKCENMITIENGIPSDPLDMKGGHINDAFMTEDERLTPL

### 3.2.3 Antistoff til Tmem27

Stoff	Kvalitet	Leverandør
Transmembrane Protein 27 (TMEM27) (AA 17-137) antibody	-	antibodies-online GmbH, Aachen, Tyskland.

### 3.2.4 Øvrige stoffer

Stoff	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril, CH <sub>3</sub> CN	Hypergrade for LC-MS, rehet ≥ 99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Metanol, CH <sub>3</sub> OH	Hypergrade for LC-MS, rehet ≥ 99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Maursyre, HCOOH	For MS, ~98 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, USA
Ammoniumbikarbonat, CH <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, USA
DTT, dithiothreitol, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	For molekylærbiologi ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, USA
IAA, jodedikksyre, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> IO <sub>3</sub>	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, USA
Trypsin fra bovin pankreas	≥ 10,000 BAEE units/mg protein, 13631 enheter/mg protein, 96,1 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, USA
Tween 20, C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub>	-	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, USA
Albumin, fra bovint serum (BSA)	BioReagent, suitable for cell culture, lyophilized powder, ≥96 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, USA
Serum fra friske frivillige	-	Oslo Universitetssykehus, Oslo, Norge
Natriumfosfat, dihydrat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	For analyse, ≥99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumfosfat, monohydrat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	For analyse, 99,0-102,0 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid, NaCl	For analyse, ≥ 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid, KCl	For analyse, > 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumdihydrogenfosfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	For analyse, ≥ 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
NaOH	For analyse	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

### 3.3 Løsninger

#### Standarder og antistoff:

Tmem27-IgG:

Standarden finnes som disulfidkoblede homodimerer, hver med en molekylvekt på ~ 41 kDa, og en renhet på > 95 %. Frysetørket produkt fortynnes med PBS pH 7,4 til 500 µg/mL, og aliquoterer ut til oppbevaring i fryser, for å unngå gjentatte frys/tin, som kan denaturere proteinet.

Tmem27-GST:

Standarden har en molekylvekt på ~ 51,6 kDa, og er ferdig løst med konsentrasjon 0,03 µg/µL, i en buffer med 50 mM Tris-HCl, 10 mM redusert glutation, med pH 8,0.

Antistoff til Tmem27:

Dette polyklonale antistoffet har affinitet til epitopen 17-137 på antigenet Tmem27.

Konsentrasjonen av antistoffer er 200 µg/mL i en PBS-buffer med oppgitt 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 50 % glycerol, og natriumazid for konservering, med fysiologisk pH 7,4.

#### Mobilfaser:

Mobilfase A (MFA): 20 mM FA:ACN, 95:5

Mobilfase B (MFB): 20 mM FA:ACN, 5:95

#### Til redusering, alkylering og trypsinspalting:

Ammoniumbikarbonatbuffer (ABC), 50 mM: pH ~8, brukes dagfersk, og holdes kald. 10 mL: 39,53 mg ammoniumbikarbonat tilsettes 10 mL ionebyttet vann fra MilliQ vannanlegg.

Ditiotretiol (DTT), 50 mM: Reduseringsmiddel for disulfidbruer. 1 mL: 7,7125 mg ditiotretiol tilsettes 1 mL 50 mM ABC.

Jodeddiksyre (IAA), 250 mM : Alkyleringreagens. 1 mL: 48,4875 mg jodeddiksyre tilsettes 1 mL 50 mM ABC-buffer.

Trypsin: Brukes fersk, iskald. 20 µg/mL: Stamløsning 1 mg trypsin/1 mL 50 mM ABC-buffer, fortynnes til 1 mL: 20 µL trypsin stamløsning + 980 µL 50 mM ABC-buffer.

Fosfatbufret saltløsning (PBS), 10 mM, 10 x PBS: pH 7,4. 100 mL: 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 240 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  løses i 100 mL ionebyttet vann.

1 x PBS: 1 del PBS 10 mM fortynnes med 9 deler ionebyttet vann.

PBS med 0,05 % tween 20 pH 7,4: 100 mL 1 x PBS tilsettes 50 µL Tween 20.

### **Til immunoaffinitetsekstraksjon:**

Vaske- og koblingsbuffere til nakne magnetkuler:

Buffer B: 0,1 M natriumfosfatbuffer, pH 7,4. 100 mL: 26,2 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 144,2 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , juster til 100 mL med ionebyttet vann, fra Milli-Q vannanlegg.

Buffer C: 3 M ammoniumsulfatbuffer, pH 7,4. 100 mL: 39,64 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  løst i Buffer B. pH justert til 7,4 med NaOH, justert til 100 mL med Buffer B. Buffer C brukes også for å øke mangden antistoff koblet til kulene.

Buffere for vasking av antistoff-koblede kuler:

Buffer D: PBS pH 7,4 med 0,5 % (w/v) BSA. 50 mL: 0,5 % (w/v) tilsvarer 250 mg BSA, som justeres til 50 mL med PBS.

Buffer E: PBS pH 7,4 med 0,1 % (w/v) BSA. 50 mL: 0,1 % (w/v) tilsvarer 50 mg BSA, som justeres til 50 mL med PBS. Buffer E kan også brukes til lagring.

## 4 Metode

### 4.1 Tillaging av antistoffkoblede kuler

#### 4.1.1 Klargjøring av magnetiske kuler

1. Reløs Dynabeads® M-280 tosylactivated magnetkuler ved å riste på vortexmikser i 10 sekunder.
2. Overfør 5 mg magnetkuler, tilsvarende 166,6 µL magnetkuleløsning, til 1,5 mL prøverør.
3. Tilsett 1 mL Buffer B, og vortex i 10 sekunder.
4. Sett prøverør i magnetstativ i 1 minutt.
5. Pipetter ut supernatanten, og kast denne.
6. Ta prøverør vekk fra magnetstativ og reløs i 166,6 µL Buffer B.

#### 4.1.2 Koble antistoff til magnetiske kuler

1. Overfør 166,6 µL vasket kuleløsning til nytt prøverør. Sett i magnetstativ i 1 minutt, og kast supernatant.
2. Reløs magnetkuler i 500 µL Tmem27 antistoffløsning, vortex i 10 sekunder.
3. Tilsett 333,3 µL Buffer C, vortex i 10 sekunder.
4. Sett prøverør på risting i HulaMixer® ved 1100 rpm i 20 timer.
5. Sett prøverør i magnetstativ i 1 minutt, kast supernatanten.
6. Tar prøverør vekk fra magnetstativ, tilsett 1 mL Buffer D og sett på risting på HulaMixer® ved 1100 rpm i 3 timer.
7. Sett prøverør i magnetstativ i 2 minutter, kast supernatanten.

8. Ta prøverør vekk fra magnetstativet, tilsett 1 mL Buffer E, vortex i 10 sekunder.
9. Setter prøverør i magnetstativ i 2 minutter, kast supernatanten.
10. Gjenta 8+9 en gang.
11. Reløs og fortynn magnetkulene i 500  $\mu$ L Buffer E, til konsentrasjon 5 mg magnetkuler per 500  $\mu$ L løsning.

## 4.2 Immunoaffinitetsekstraksjon

1. Tilsett 500  $\mu$ L PBS med tween 20 (0,05 %) til nytt prøverør.
2. Vortex antistoffkoblede magnetkuler, for å reløse dem, mellom hvert uttak.
3. Pipetter 20  $\mu$ L/5  $\mu$ L magnetkuleløsning til prøverør med PBS med tween 20 (0,05 %).
4. Vortex opp magnetkuler.
5. Sett på magnetstativ i 2 minutter, og fjern supernatanten.
6. Tilsett 1 mL serum, spiket med Tmem27.
7. Ekstraher i 30 minutter på HulaMixer®.
8. Sett prøverør i magnetstativ i 2 minutter, og fjern supernatanten.
9. Vask med 500  $\mu$ L PBS med tween 20 (0,05 %), vortex i 10 sekunder, sett i magnetstativ i 2 minutter og fjern supernatanten. Gjør dette 2 ganger.
10. Vask med 500  $\mu$ L PBS, vortex i 10 sekunder, sett i magnetstativ i 2 minutter og fjern supernatanten.

## 4.3 Trypsinklipping

### 4.3.1 Klipping av Tmem27 på magnetiske kuler

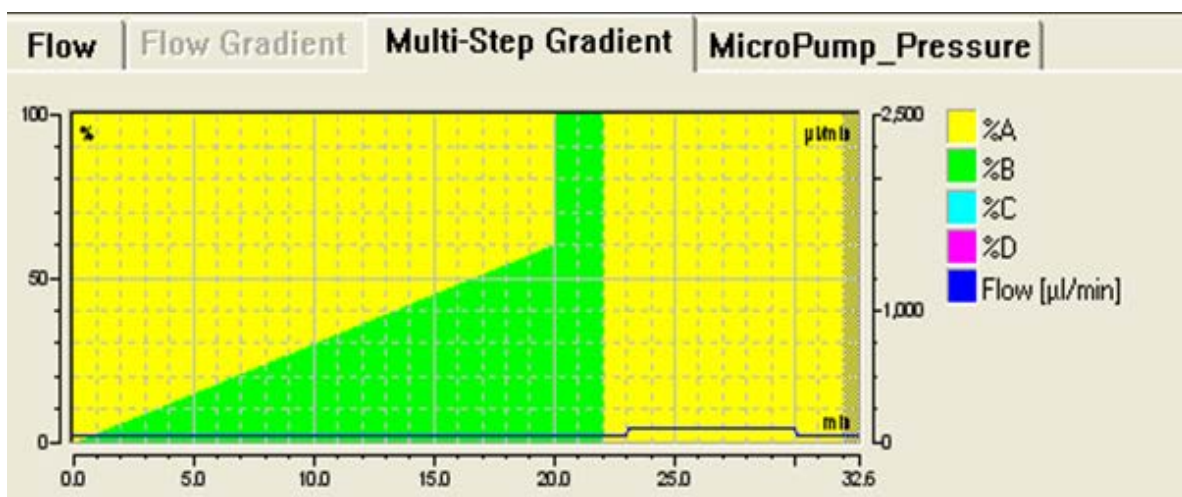
1. Reløs komplekset med magnetkuler, antistoff og Tmem27 i 85  $\mu$ L 50 mM ABC-buffer.
2. Tilsett 5  $\mu$ L 50 mM DTT, vortex i 10 sekunder, og inkuber på Thermomixer® ved 95° C i 15 minutter.
3. Avkjøl til romtemperatur.
4. Tilsett 5  $\mu$ L 250 mM IAA, vortex i 10 sekunder. La stå mørkt, i romtemperatur, 15 minutter.
5. Tilsett 5  $\mu$ L fersk, kald, trypsin med konsentrasjon 20  $\mu$ g/mL, og inkuber ved 37° C med risting på Thermomixer® i 20 timer.

### 4.3.2 In solution klipping

1. Fortynn standard av Tmem27 med 85  $\mu$ L 50 mM ABC-buffer.
2. Tilsett 5  $\mu$ L 50 mM DTT, vortex i 10 sekunder, og inkuber på Thermomixer® ved 95° C i 15 minutter.
3. Avkjøl til romtemperatur.
4. Tilsett 5  $\mu$ L 250 mM IAA, vortex i 10 sekunder. La stå mørkt, i romtemperatur, 15 minutter.
5. Tilsett 5  $\mu$ L fersk, kald, trypsin med ønsket konsentrasjon, og inkuber ved 37° C med risting på Thermomixer® i 20 timer.

## 4.4 MRM LC-MS/MS Trippelkvadrupol

1. Prøverør med enzymspaltet Tmem27 tas av prøveblanderen og avkjøles til romtemperatur. Prøven vortexes og sentrifugeres, før den settes på magnet i 2 minutter.
2. 40 µL supernatant overføres til Micro-insert 0,1 mL i 11,6 mm vial.
3. Prøveløsningen injiseres på Dionex Ultimate 3000 LC-system via autosampler, og påføres BioBasic C8-kolonne, som holder 30 °C. Elueringen skjer med gradient av MFA og MFB (Figur 15).
- 4.



Figur 15 LC-gradienten. I utgangspunktet kjøres det en flow på 50 µL/min med 100 % MFA og 0 % MFB, med en lineær økning av organisk MFB til 60 % på 20 minutter. Etter 20 minutter økes MFB til 100 % i 2 minutter, før den senkes til 0 % i 10 minutter. Flow økes til 100 µL/min mellom tiden 23,1-30 minutter. Stoffer som eluerer mellom tiden 5-24,7 minutter loades til MS-detektoren, mens resten injiseres til waste.

5. MS-systemet er et trippelkvadrupolsystem. ESI utføres i positiv modus, og kapillærtemperaturen er på 270 °C. N<sub>2</sub> brukes som både forstøvergass og tørkegass. Kollisjon skjer med Ar-gass under 1,7 mTorr trykk og CID-energi på 25 eV. MRM-metoden har en scantid på 0.25 sekunder, og en scan event for hver av peptidene T5 og T14. m/z-verdier for [M<sup>2+</sup>] peptidmolekylionene, og fragmentene i Tabell 4. Eluenter fra LC i tidsrommet 5-24,7 minutter loades til detektor, hvor et spekter tas opp.

T-peptid	AA sekvens	Scan event	CID	m/z peptidion [M2+]	m/z fragmentation	fragment
T5	AYAWDTNEEYLFK	1	25 eV	825,7	708.1	b6
				825,7	1158.6	y9
T14	INNAFFLNDQTLFLK	2	25 eV	964,3	1108.1	y9
				964,3	1368.4	y11

Tabell 4 Oversikt over verdier til MRM-metoden, med m/z for peptidioner og fragmentioner



## 5 Resultater og Diskusjon

Ekstracellulær, avspaltet Tmem27 og intakt Tmem27 kan tenkes å kunne si noe om  $\beta$ -cellemasse og skade (1, 3). For å måle dette skal det utvikles en LC-MS/MS-metode, med immunoaffinitetsekstraksjon og trypsinklipping som prøveopparbeidelse.

Metoden består av en prøveopparbeidelse med immunoaffinitetsekstraksjon og trypsinklipping, etterfulgt av væskekromatografi og tandem massespektrometri.

Trypsinklippingen er basert på in-house metoder, som blant annet beskrevet av Lund et al (37). Prinsippene for immunoaffinitetsekstraksjon er hentet fra en manual for Dynabeads® fra Life Technologies, samt tilpasset ved hjelp av in-house metoder (5, 38, 39).

Utviklingen av metoden ble gjort etter bottom-up-prinsippet, som tidligere beskrevet. På grunn av tilgjengelighet ble det først benyttet en ekstracellulær standard av Tmem27, Tmem27-IgG, og senere en standard med hele aminosyresekvensen, Tmem27-GST. Det ble foretatt in silico trypsinklipping i ProteinProspector, etterfulgt av databasesøk i Protein BLAST etter tryptiske peptider som er spesifikke for Tmem27 (35, 36). Standardene ble enzymatisk kløyyet til tryptiske peptider, og gjennomgikk datadependent-analyse (9). Funnene fra datadependent-analysen og in silico klipp ble sammen brukt til å velge ut signaturpeptider. I MS-instrumentet ble peptidene utsatt for fragmentering, og de to med høyest intensitet for hvert peptid ble utvalgt til å bli med videre i metoden. Til slutt ble det utviklet en metode for immunoaffinitetsekstraksjon av Tmem27 fra serum, som ble brukt til vellykket ekstraksjon av Tmem27-standard fra serum, bekreftet av resultater fra LC-MS/MS.

### 5.1 In silico trypsinklipp

ProteinProspector, MS-Digest ble brukt til å utføre in silico trypsinklipp av Tmem27 (35). Resultatet vises i Tabell 5. De tryptiske peptidene T1-T23 er nummerert fra den ekstracellulære N-terminalen, via det transmembrane domenet, til den intracellulære C-terminalen. For peptidene som er spesifikke for Tmem27 er det oppgitt E-verdi fra Protein BLAST (36).

<b>Tryptisk peptid</b>	<b>Sekvens</b>	<b>Aminosyreområde</b>	<b>E-verdi</b>	<b>Domene</b>
<b>T1</b>	<b>MLWLLFFLVTAIHA-ELCQPGAENAFK</b>	<b>M1-K26</b>	<b>5E-22</b>	<b>Signalpeptid M1-A14, ekstracellulær M1-K26</b>
T2	VR	V27-R28	-	ekstracellulær
T3	LSIR	L29-R32	-	ekstracellulær
T4	TALGDK	T33-K38	-	ekstracellulær
<b>T5</b>	<b>AYAWDTNEEYLFK</b>	<b>A39-K51</b>	<b>1E-08</b>	<b>ekstracellulær</b>
<b>T6</b>	<b>AMVAFSMR</b>	<b>A52-R59</b>	<b>7E-03</b>	<b>ekstracellulær</b>
T7	K	K60-K60	-	ekstracellulær
T8	VPNR	V61-R64	-	ekstracellulær
<b>T9</b>	<b>EATEISHVLLCNVTQR</b>	<b>E65-R80</b>	<b>2E-10</b>	<b>ekstracellulær</b>
<b>T10</b>	<b>VSFWFVVTDP SK</b>	<b>V81-K92</b>	<b>7E-07</b>	<b>ekstracellulær</b>
<b>T11</b>	<b>NHTLPAVEVQSAIR</b>	<b>N93-R106</b>	<b>5E-08</b>	<b>ekstracellulær</b>
T12	MNK	M107-K109	-	ekstracellulær
T13	NR	N110-R111	-	ekstracellulær
<b>T14</b>	<b>INNAFFLNDQTLEFLK</b>	<b>I112-K127</b>	<b>6E-11</b>	<b>ekstracellulær</b>
<b>T15</b>	<b>IPSTLAPPMDPSVP-IWIIIFGVIFCIIIVAIALLI-LSGIWQR</b>	<b>I128-R169</b>	<b>1E-21</b>	<b>ekstracellulær I128-P141, transmembran I142-I162, intracellulær L163-R169</b>
T16	R	R170-R170	-	intracellulær
T17	R	R171-R171	-	intracellulær
T18	K	K172-K172	-	intracellulær
T19	NK	N173-K174	-	intracellulær
<b>T20</b>	<b>EPSEVDDAEDK</b>	<b>E175-K185</b>	<b>3E-05</b>	<b>intracellulær</b>
<b>T21</b>	<b>CENMITIENGIPSDPLDMK</b>	<b>C186-K204</b>	<b>5E-15</b>	<b>intracellulær</b>
<b>T22</b>	<b>GGHINDAFMTEDER</b>	<b>G205-R218</b>	<b>4E-09</b>	<b>intracellulær</b>
T23	LTPL	L219-L222	-	intracellulær

Tabell 5 Oversikt over alle de tryptiske peptidene i Tmem27, fra N-terminal til C-terminal. E-verdi er hentet fra Protein BLAST, for de av peptidene som er spesifikke for Tmem27 (36).

Ideelle lengder på tryptiske peptider er 6-20, som tidligere nevnt (7). Peptider som faller utenfor denne størrelsen utelukkes likevel ikke dersom de er spesifikke for Tmem27, og dersom de gir god deteksjon.

### Spesifisitet av signaturpeptider

For å undersøke om de tryptiske peptidene er spesifikke for Tmem27, testes de i Protein BLAST (36). Protein BLAST er en søkealgoritme, som kobler aminosyresekvenser opp mot databaser med proteiner, i vårt tilfelle UniProtKB/Swiss-Prot (40). Innstillinger og søkeresultater for T14 vises i henholdsvis Vedlegg Ia og Ib. Søket genererer en liste over potensielle proteiner aminosyresekvensen kan stamme fra, med de mest sannsynlige øverst. For T14 oppgis Tmem27 som det mest sannsynlige proteinet, med høyest Score (55,8), lavest

Expect-verdi (E-verdi,  $6e-11$ ) og treff for alle 16 aminosyrene. E-verdien beskriver hvor mange treff for søket man kan regne med å få helt tilfeldig, og en verdi nær null gir et mer signifikant resultat (41). Korte sekvenser bør likevel undersøkes utover E-verdien, da lignende sekvenser også kan gi lav E-verdi (41). Det neste proteinet på lista er ACE2, som har samme evolusjonære opphav som Tmem27 (18). De skal likevel ikke kunne forveksles, da ACE2-sekvensen har byttet ut 4 av aminosyrene, og mangler den siste lysin. Tabell 5 inkluderer E-verdier for de tryptiske peptidene som viste seg å være spesifikke for Tmem27.

## 5.2 Valg av ekstracellulære signaturpeptider

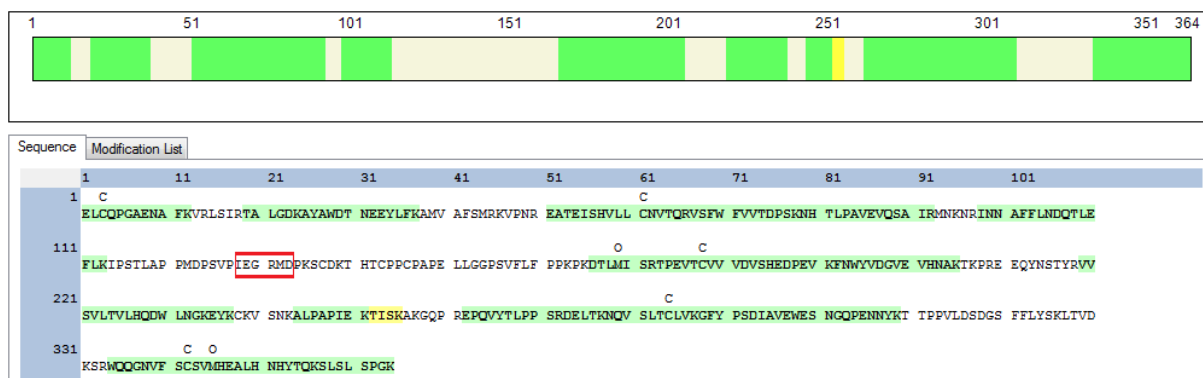
Kriteriene for valg av signaturpeptider ble definert som at de skulle være spesifikke for Tmem27 (lav E-verdi), være godt målbare i MS (høy krysskorrelasjon (XCorr)), ikke inneholde missed cleavages, eller uønskede modifikasjoner, og de skulle gi høye topper i MS1 og MS/MS. XCorr-verdien er en funksjon av likheten mellom m/z-verdier fra fragmenter observert i MS/MS, og predikerte m/z-verdier fra databaser av kjente aminosyresekvenser (42).

På grunn av vanskeligheter med tilgang på standardsubstans ble ekstracellulær del undersøkt først, med Tmem27-IgG. Denne standarden består av ekstracellulær Tmem27 (E15-P141), en spacer (IEGRMD), og IgG<sub>1</sub> (P100-K330).

### Datadependent scan i LTQ-Orbitrap

Den ekstracellulære standarden Tmem27-IgG gjennomgikk en in solution trypsinklipp og datadependent scan i LTQ-Orbitrap, for at vi skulle kunne se nærmere på de ekstracellulære peptidene. 20  $\mu$ L trypsinert prøveløsning á 5  $\mu$ L/mL Tmem27-IgG, det vil si 100 ng, ble injisert på LTQ-Orbitrap, og det ble gjort en datadependent analyse over 87 minutter, med CID på 35 eV.

Filen med rådata fra datadependent scan ble åpnet i Thermo Proteome Discoverer 1.4, via Sequest HT Search Wizard, for å se hvilke peptider som var målbare i prøven. Innstillinger for søk i Vedlegg II. Resultatene fra søket vises i Figur 16 og Figur 17.



Figur 16 Dekningsgrad av Tmem27-IgG i Proteome Discoverer 1.4. Først i sekvensen vises den ekstracellulære delen av Tmem27, spaceren er bokset inn med rødt, etterfulgt avdelen fra IgG<sub>1</sub>.

	A2	Sequence	XCorr	MH+ [Da]	Charge	# Missed Cleavages	Modifications	RT [min]
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	INNAFFLNDQTLFLK	5.28	1926.99565	2	0		48.97
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	EATEISHVLLcNVTQR	4.80	1870.93022	2	0	C11(Carboxymethyl)	36.49
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AYAWDTNEEYLFK	4.39	1649.74541	2	0		41.28
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NHTLPAVEVQSAIR	3.55	1534.83061	2	0		28.40
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	VSFWFVVTDPK	2.77	1411.72222	2	0		46.33
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TALGDK	1.57	604.32861	1	0		10.87

Figur 17 Oversikt over tryptiske peptider fra Tmem27 detektert under datadependent scan med LTQ-Orbitrap. Fra øverst, med høyest XCorr-verdi: T14, T9, T5, T11, T10 og T4. Av disse er det bare T4 som ikke er spesifikk for Tmem27 (36).

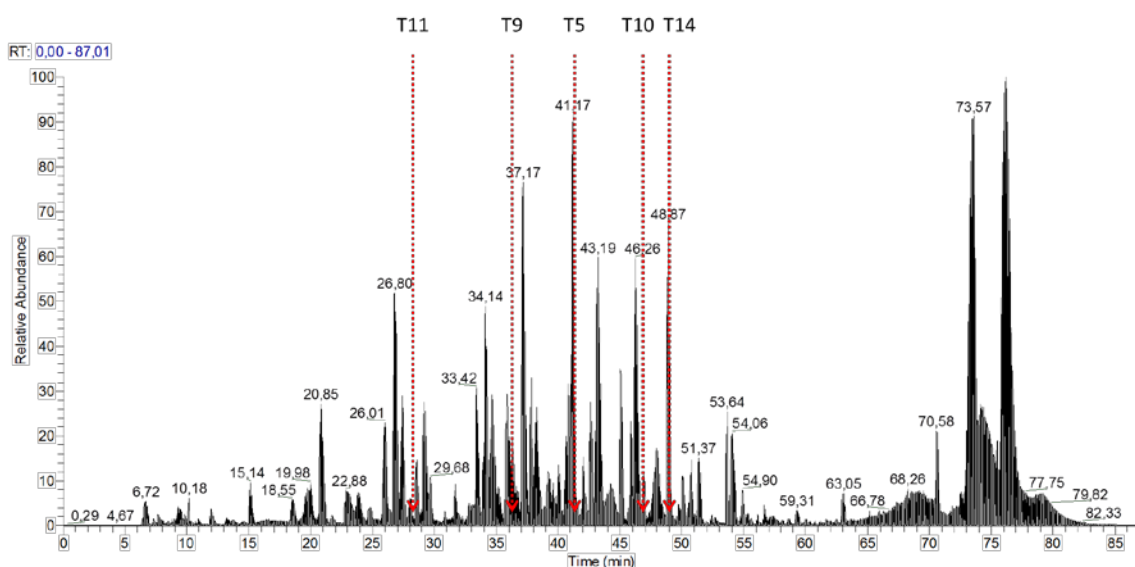
Resultatene viser at søket gir 65,66 % dekningsgrad av sekvensen til standarden Tmem27-IgG. De grønne områdene er peptider som mest sannsynlig er detektert; T1, T4, T5, T9, T10, T11, T14. Gule områder er litt mer usikre, røde (ingen her) enda mer usikre, og hvite er ikke detektert.

Det er bare bidraget fra Tmem27 (her E1-P127) som er interessant med tanke på signaturpeptider. Hele sekvensen til standarden Tmem27-IgG er likevel inkludert her; for å illustrere at over halve standarden er noe annet enn Tmem27, og for å vise at to av de tryptiske peptidene, T1 og T15, bare er delvis tilstede. Delene av T1 og T15, finnes i ytterpunktene av bidraget fra Tmem27. Signalpeptidet i Tmem27 (aminosyresekvens M1-A14) er ikke med i standarden Tmem27-IgG, og spaceren kutter T15 (43). Resultater fra denne standarden vil dermed ikke kunne si noe om hvorvidt T1 og T15 kan egne seg som signaturpeptider in vivo. Ettersom begge er >20 aminosyrer store, er det likevel sannsynlig at de ikke er egnet (7).

Foruten området rundt spaceren er det mangelfull deteksjon for peptidene T2, T3, T6, T7, T8, T12 og T13. Bortsett fra T6 er disse så korte (<6 aminosyrer) at de likevel ikke egner seg som signaturpeptider, fordi peptidsekvensen sannsynligvis også finnes i andre proteiner (7, 36).

Figur 17 viser en liste over peptidene fra Tmem27, som ble detektert under søket. Øverst er de med høyest XCorr-verdi, som er de av peptidene i databasen (her definert til Tmem27-IgG), som korrelerer best med funnene fra prøven. Oppgitte modifikasjoner inkluderer her karboksymetylgrupper og oksidasjon. På grunn av IAA-alkyleringen før trypsinklippen, skal karboksymetylgruppene på cystein være tilstede, som en konstant modifikasjon. Oksidering er derimot uønsket, da disse ikke er konstante og medfører uregelmessigheter i MS-analysen. Figuren viser også hvilken ladning peptidet har blitt detektert med. Dette er informasjon som er viktig når man skal finne igjen peptidene fra MS-spektre, ved hjelp av  $m/z$ , og når man skal lage spesifikke metoder, som for eksempel MRM. Missed cleavage-peptider bør unngås til bruk som signaturpeptid, da det kan være vanskelig å kontrollere andelen som kløyves fullstendig og ikke (44). Dette kan for eksempel føre til falske negative, og et lavere signal enn det som faktisk er tilfellet.

Kromatogrammet fra datadependent scan og tilhørende MS/MS-spektre for de tryptiske peptidene viser at T5 gir høyest signal, etterfulgt av T14, T9, T10 og T11 (Figur 18, Figur 20 og Vedlegg IIIa-IIIId).



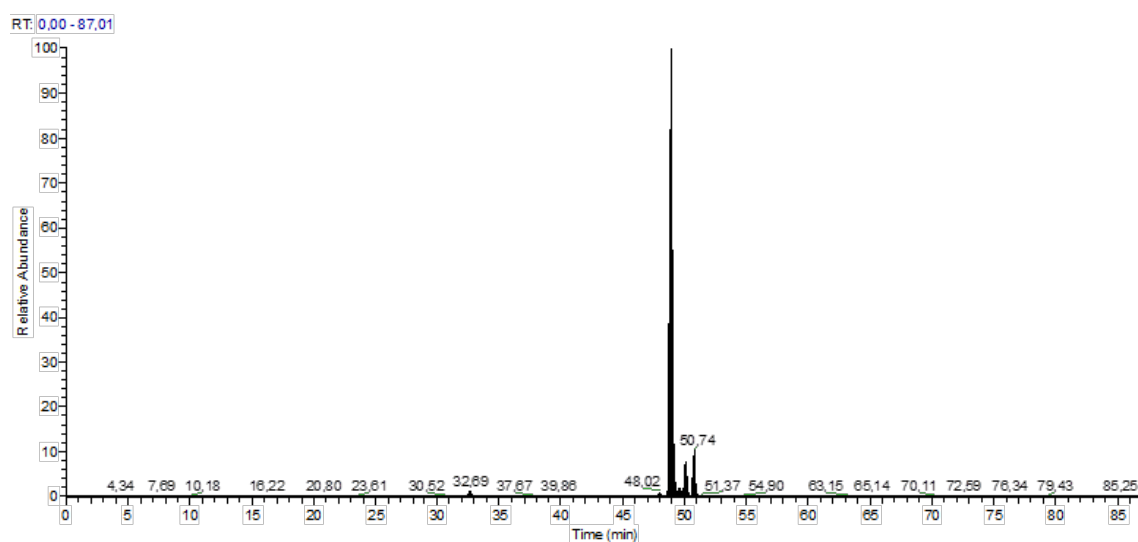
Figur 18 Base peak kromatogram av LTQ-Orbitrap datadependent analyse på 87 minutter. Retensjonstidene til peptidionene er markert.

## Signaturpeptider T5 og T14

Basert på funnene var det T5 og T14 som best oppfylte kriteriene som signaturpeptider for Tmem27. T5, T9, T10, T11 og T14 er alle spesifikke for Tmem27, og ble detektert i MS. T14 viste høyest XCorr-verdi, og deretter T9, T5, T11, T10. T5 målte høyest toppintensitet, både for MS1 og MS/MS, fulgt av T14, T9, T11 og T10. I sum ble T5 og T14 vurdert som de beste kandidatene for signaturpeptider.

Bekreftelse på identitet av signaturpeptid T14 (T5 i Vedlegg IIIa):

MS1 viser uttrekk av m/z-verdien (963,49) til T14 i Figur 19.

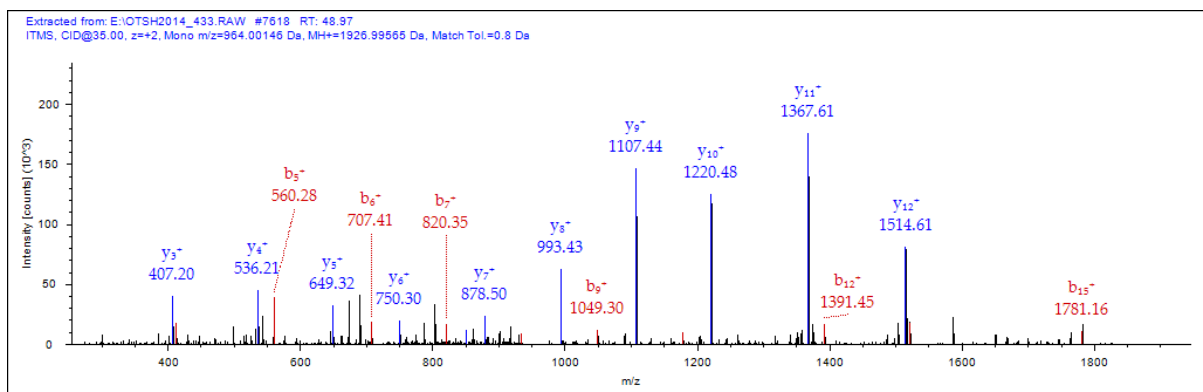


Figur 19 Ioneuttrekk av T14, fra kromatogrammet i Figur 18. Uttrekket ble utført ved å søke opp m/z-verdien for peptidionet, på 963,49.

Tabell 6 viser hvordan T14 deles inn i b- og y-ioner, etter hvor i sekvensen fragmenteringen skjer, og hvilke masser fragmentene har. Figur 20 viser MS/MS-spekter med b og y fragmentioner, som bekrefter peptidionet T14.

b+	Fra N-terminal	Aminosyre	Fra C-terminal	y+
-	1	I	16	-
228,13	2	N	15	1813,91
342,18	3	N	14	1699,87
413,21	4	A	13	1585,83
560,28	5	F	12	1514,79
707,35	6	F	11	1367,72
820,44	7	L	10	1220,65
934,48	8	N	9	1107,57
1049,51	9	D	8	993,53
1177,56	10	Q	7	878,5
1278,61	11	T	6	750,44
1391,7	12	L	5	649,39
1520,74	13	E	4	536,31
1667,81	14	F	3	407,27
1780,89	15	L	2	206,2
-	16	K	1	147,11

Tabell 6 Teoretiske masseverdier for b- og y-ioner for T14.



Figur 20 MS/MS-spekter av b- og y-ioner for T14. Funn av flere fragmentioner øker sannsynligheten for at peptidet T14 er tilstede, og dermed proteinet Tmem27.

Thermo Proteome Discoverer gjør det mulig å koble teoretiske verdier for fragmentioner til de som er tilstede i den analyserte prøven. Figur 20 viser treff for flere b-ioner (røde) og y-ioner (blå), som er med på å underbygge at det er peptidionet T14 man ser, og i forlengelsen proteinet Tmem27. Hele y-rekka fra y3 til y12, og b5-7, 9,12 og 15 er detektert, som er en meget god bekreftelse. Fragmentene med høyest intensitet er her y-ionene y9, y10, y11. Hvilke fragmenter som er mest fremtredende kan variere fra MS-system til MS-system, og med hvilken fragmenteringsenergi (CID) man bruker. Ved bytte av MS-system bør dette optimaliseres.

## 5.3 Innledende optimalisering av kollisjonsenergi, og valg av fragmentioner

Frem til dette punktet har LTQ-Orbitrap blitt brukt. Målet var å utføre videre forsøk på trippelkvadrupol, som er mer hensiktsmessig for rutineanalyser, da dette systemet gir høyere følsomhet. På grunn av manglende kapasitet på trippelkvadrupol, ble innledende forsøk på optimalisering utført på lineær ionefelle.

### Ionefelle

For å styrke bekreftelsen av resultatene i MS/MS (MS2) bør man optimalisere uttrykkningen av fragmentionene. Ved å endre på kollisjonsenergien (CID), som forårsaker fragmentering, kan man oppnå ulik grad av fragmentering. Et godt fragment har høy toppintensitet. Dette ble også utført med den ekstracellulære standarden, Tmem27-IgG.

En datadependent scan ble først utført på lineær ionefelle, for å finne m/z-verdier for signaturpeptidene, til en midlertidig SRM-metode. Tabell 7 viser resultater av fragmenteringsenergi med spenning på 15, 20, 25, 30 og 35 eV for signaturpeptidene T5 og T14. MS1 angir topphøyden til peptidionet, og MS2 angir intensiteten til det høyeste fragmentionet.

CID	T5		T14	
	Signalintensitet MS1	Signalintensitet MS2	Signalintensitet MS1	Signalintensitet MS2
15	-	-	-	-
20	4985	36,9	-	-
25	2010	18,9	610,5	21,7
30	1315	11,5	487,5	20,9
35	765,5	5,7	250,5	10,2

Tabell 7 Optimalisering av kollisjonsenergi på ionefelle De skraverte omsådene markerer de høyeste toppintensitetene.

For disse forsøkene ser det ut til at CID på 20 eV er mest optimalt for T5, og 25 eV for T14, da disse uttrykker høyest signal for fragmentionene.



## 5.4 Kromatografi

Kromatografi er viktig for grov separering av stoffene, og er ofte et tidkrevende trinn. For å forbedre kromatografien ble det gjort forsøk med å endre startkonsentrasjonen av mobilfasene, og tilpasse gradienten slik at den beholdt stigningstallet. Det ble også gjort forsøk på å korte ned tiden mellom eluering av signaturpeptidene og top-out med 100% mobilfase B (MFB).

Tabell 8 viser resultater fra forsøk med startkonsentrasjon av MFB på 0, 5, 10 og 15 %. Stigningstallet på gradienten ble ivarettatt, slik at tiden for eluering (RT) av peptidet ble forskjøvet.

%MFB start	T5 MS1	MS2	RT	T14 MS1	MS2	RT
0	1,74E+02	8,55E+01	16,33	1,42E+02	1,21E+02	18,61
5	2,05E+02	8,92E+01	14,61	1,59E+02	1,16E+02	16,9
10	1,86E+02	8,74E+01	12,64	1,47E+02	9,06E+01	15,26*
15	-	-	-	7,91E+01	3,95E+01	13,39*

Tabell 8 Ulike startkonsentrasjoner av MFB. Tabellen viser topphøyder for signaturpeptider og fragmenter, samt forholdet mellom disse og retensjonstiden (RT) peptidet eluerer på. \*Kromatogrammet er vanskelig å lese, på grunn av støy eller doble topper på elueringstidspunktet.

0 % startkonsentrasjon av MFB gir best resultat, men er også mest tidskonsumerende. I denne tidlige fasen av utprøvnings er det ikke like viktig med gjennomføring av mange prøver per tid, om det går på bekostning av kvaliteten. Derfor ble 0 % MFB besluttet å videreføre.

Tabell 9 viser resultater for ulike tidspunkt med igangsetting av 100% MFB, for å skylle ut rester av hydrofobe forbindelser fra kolonna.

Top-out tid	T5 MS1	MS2	RT	T14 MS1	MS2	RT
18,35	1,51E+02	5,37E+01	14,84	1,42E+02	8,20E+01	17,07
17	1,75E+02	9,13E+01	14,85	1,92E+02	1,63E+02	17,12
15	1,89E+02	9,40E+01	14,89	1,88E+02	1,59E+02	17,13

Tabell 9 Endring i tidspunkt for 100% MFB, såkalt "top-out".

På grunn av dødvolum i systemet er det omtrent fire kolonnevolum, eller 4 minutter, fra en kommando settes i gang til den gir utslag. Dette er grunnen til at det går an å starte 100% MFB 2 minutter før elueringstidspunktet til T14. Endringen i RT er så liten at det nok skyldes normalvariasjon, men det kan se ut til at det er en svak økning med kortere tid til «top-out».

Ratioen mellom MS1 og MS2 ser ut til å være bedre hos de to kjøringene med kortest tid til «top-out» med 100% MFB.

## 5.5 Linearitet og deteksjonsgrense

Flere forsøk har blitt gjort for å teste hvor langt ned i konsentrasjon av Tmem27 metoden klarer å detektere. Dessverre er det lite resultater å vise til fra disse forsøkene.

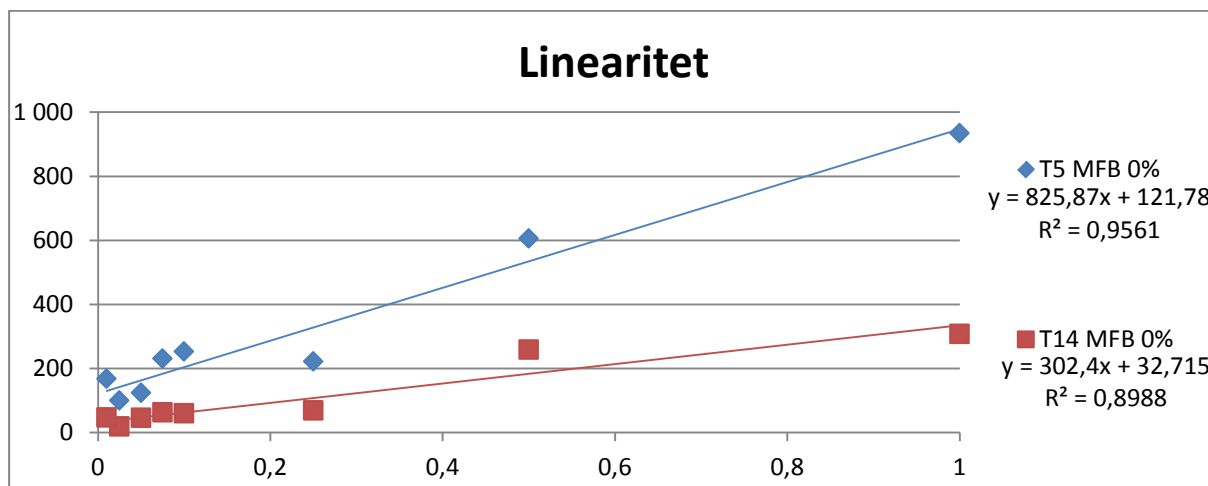
Tabell 10 viser et linearitetsforsøk fra ionefelle på standard Tmem27-IgG, med injiserte mengder fra 0,2 – 20 ng. Prøvene er alle fortyninger av samme trypsinklipp, resultatene er gjennomsnittet av to injiseringer for hver konsentrasjon.

Tmem27-IgG		Topp høyde			
ng injisert	µg/mL	T5 MFB 0%	T14 MFB 0%	T5 MFB 5%	T14 MFB 5%
20	1	9,34E+02	3,08E+02	9,25E+02	2,88E+02
10	0,5	6,05E+02	2,59E+02	5,67E+02	2,43E+02
5	0,25	2,22E+02	6,88E+01	2,27E+02	5,14E+01
2	0,1	2,53E+02	5,97E+01	2,34E+02	6,05E+01
1,5	0,075	2,31E+02	6,30E+01	2,14E+02	6,29E+01
1	0,05	1,24E+02	4,57E+01	7,95E+01	2,73E+01
0,5	0,025	9,96E+01	1,91E+01	5,26E+01	1,71E+01
0,2	0,01	1,68E+02	4,69E+01	1,92E+01	-

Tabell 10 Topp høyder målt for de tryptiske peptidene T5 og T14, for en konsentrasjonsrekke av Tmem27-IgG, med to ulike startkonsentrasjoner av MFB. Forsøkene ble utført på ionefelle, og verdiene er gjennomsnittet av to injeksjoner.

Høyden på peptidtoppene i kromatogrammet ble brukt som mål på signalstyrken, For alle kjøringene ble det registrert tydelige topper, med unntak for konsentrasjon 0,01 µg/mL Tmem27-IgG, 5 % MFB, for det tryptiske peptidet T14. Trenden ser ut til å være høyere topper for startkonsentrasjon MFB på 0 %, og signalet ser også ut til å være høyere for T5 enn T14. Det ser også ut til å være en positiv sammenheng mellom konsentrasjon og topp høyde.

Figur 21 er en lineær tilpassing av resultatene fra Tabell 10 for T5 (blå) og T14 (rød).



Figur 21 Linearitet for de tryptiske peptidene T5 (blå) og T14 (rød).

Det er få punkter fra 1 µg/mL til 0,25 µg/mL, men verdiene ser ut til å korrelere med regresjonslikningen for en rett linje. Spesielt for T5 er  $R^2$  nærme 1, mens T14 er litt lengre unna en perfekt linje. Punktene som avviker fra linja ser ut til å være de samme konsentrasjonene for begge signaturpeptidene, som kommer av at de er fra de samme prøvefortynningene. Linja til T5 har brattere nedstigning enn T14. I tillegg til manglende parallell er det en svakhet i at fortynningene ikke går ned til lavere konsentrasjoner. Ut ifra disse resultatene kan det antas at man kan gå enda lenger ned i konsentrasjon, og fremdeles oppnå detekterbare resultater.

Ett av formålene med metodeutviklingen er å kunne måle konsentrasjoner av Tmem27 for kliniske prøver. Med ionefellen ble det detektert mengder av Tmem27-IgG ned i 200 pg for mengder injisert i MS.

## 5.6 Multipel reaksjonsmonitorering (MRM)

### 5.6.1 Trippelkvadrupol (QqQ)

Ved overgang til trippelkvadrupol ble optimaliseringen for kollisjonsenergi gjentatt (T14 i Tabell 11 og T5 i Vedlegg IV). Fra en product ion scan så det for T14 ut til å være de fragmentasjonene b7 ( $m/z = 820,4$ ), y9 ( $m/z = 1108,1$ ) og y11 ( $m/z = 1368,4$ ) som ga høyest signal. For T5 var kandidatene y4 ( $m/z = 570,6$ ), b5 ( $m/z = 607,2$ ), y5 ( $m/z = 699,2$ ), b6 ( $m/z = 708,1$ ), y7 ( $m/z = 942,5$ ), y8 ( $m/z = 1043,5$ ), b9 ( $m/z = 1080,4$ ), y9 ( $m/z = 1158,6$ ), y10 ( $m/z = 1344,63$ ) og y11 ( $m/z = 1415,8$ ). En midlertidig SRM-metode ble satt sammen av T14,

T5 og tilhørende fragmentioner. CID på 18, 20, 23, 25, 27, 30 og 35 eV ble testet, og topphøyder ble målt for peptidioner og fragmentioner.

T14	MS1	MS2	MS2	MS2
CID eV	964,3	Signalintensitet 820,4 b7	Signalintensitet 1108,1 y9	Signalintensitet 1368,4 Y11
18	115,5	9,44	6,51	14,5
20	116	8,14	23,55	13,2
23	510	26,96	90,9	95,65
25	419,5	7,61	84,45	53,4
27	617,5	8,42	89,2	81,9
30	607	10,64	72,65	62,65
32	646	6,99	102,5	98,65

Tabell 11 Optimalisering av kollisjonsenergi på trippelkvadrupol. Topphøyder til peptidion T14 (MS1) og tre fragmentioner (MS2) ved ulike kollisjonsenergier (CID). Verdiene er gjennomsnitt av to injiseringer.

For T5 ble CID 25 eV valgt, med fragmentionene b6 ( $m/z = 708,1$ ) og y9 ( $m/z = 1158,6$ ) (Vedlegg IV). De nevnte fragmentionene viste best intensitet, og for y9 var 25 eV den klart beste kollisjonsenergien. b6 viste noe bedre resultat for 23V. Grunnen til at 25 eV likevel ble valgt for begge var et kompromiss for å ha færrest mulig variabler i metoden, for å unngå at det gikk ut over ytelsen til systemet. For T14 viste ionene y9 og y11 gjennomgående bedre signal enn b7, og ble valgt som fragmentioner. Ett unntak er målingen for CID 18 eV, der b7 gir bedre resultat enn y9. Dette har likevel ingen betydning, ettersom de øvrige målingene for både y9 og y11 gir bedre resultater enn 18V-målingen til b7. Valg av CID ble gjort på samme grunnlag som hos T5, og endte på et kompromiss på 25 eV.

Resultatene fra valg av signaturpeptider, kollisjonsenergi, fragmentioner og kromatografi ble satt sammen til en multiplere reaksjonsmonitorerings-metode (MRM), med grunninnstillinger basert på tidligere metoder (45). MRM tilsier at overganger fra flere peptidioner i MS1 til flere fragmentioner i MS2 inngår i metoden (25).

I dette tilfellet med CID 25 eV, en scanevent for hvert peptid med disse overgangene.

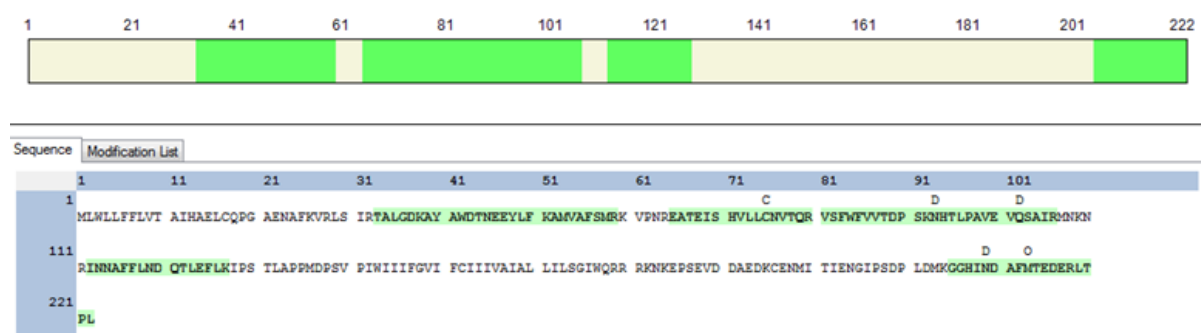
## 5.7 Valg av signaturpeptider for intakt Tmem27

Tilgang på standard av Tmem27 med full lengde, Tmem27-GST, muliggjorde undersøkelser etter peptider som var utelukkende intracellulære eller transmembrane. Dette var nødvendig

for å fastslå deteksjon av intakt Tmem27. Tmem27-GST inneholder hele aminosyresekvensen til Tmem27, koblet til.

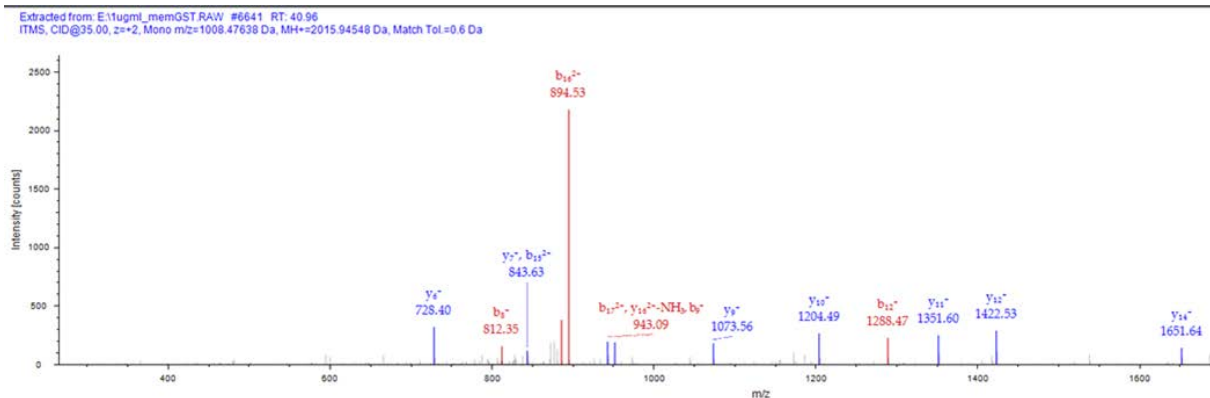
Innledende forsøk på LTQ-Orbitrap, utført på ekstracellulær standard Tmem27-IgG, ble gjentatt for standard med intakt aminosyresekvens for Tmem27, med Tmem27-GST. Dette ble gjort for å bekrefte tidligere funn av peptider, og for å lete etter en intakt markør for intracellulær del.

Tmem27-GST gjennomgikk trypsinklipp og datadepotent analyse, og resultatet er vist i Figur 22



Figur 22 Viser coverage etter datadependent scan på LTQ-Orbitrap med standard Tmem27-GST, etter in solution trypsinklipp

Datadependent analyse av Tmem27-GST viser treff for de ekstracellulære signaturpeptidene T5 og T14. I tillegg blir T6 detektert her, men på grunn av lav signalintensitet blir den ikke inkludert som signaturpeptid. Analysen viser få treff i det intracellulære området. T22 ser ut til å være det eneste tryptiske peptidet som lar seg måle i MS. Dessverre ser det ut til at det ofte får ufullstendig kløyving fra T23, som til gjengjeld gir sterkere signal. Foreløpig er det valgt å gå videre med den ufullstendige kløyvingen, da påvisning er viktigere enn kvantifisering på dette stadiet av metodeutviklingen (Figur 23).



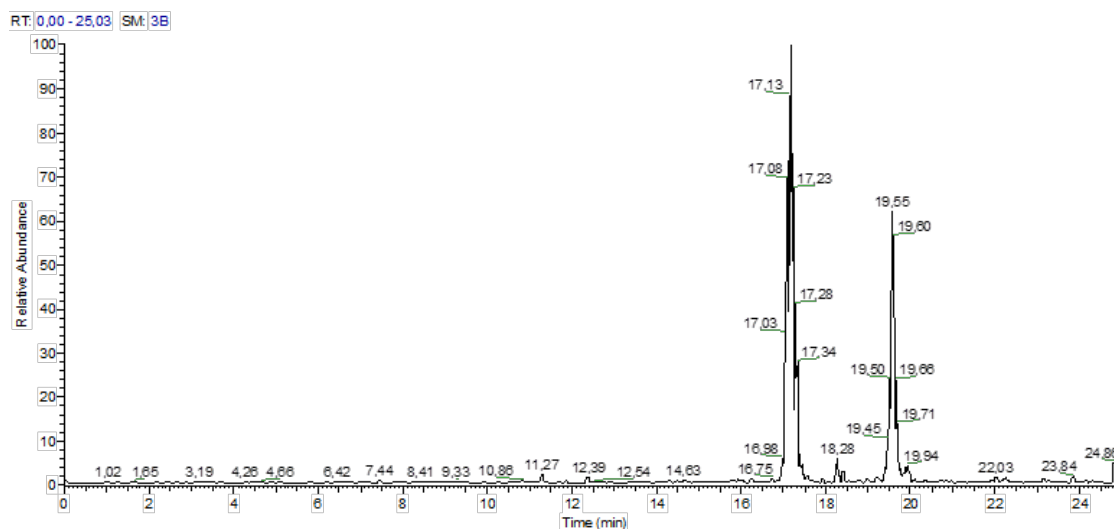
Figur 23 MS/MS av missed cleaved T22+T23

Et alternativ til missed cleaved T22+T23 kan være T14. Dette fordi alle kløvestedene til Bace2 sitter på T14, så dersom hele T14 er intakt kan det tyde på at peptidet stammer fra intracellulær Tmem27.

## 5.8 Immunoaffinitetsekstraksjon

Litteratursøk tyder på at det ikke finnes utviklede metoder for immunoaffinitetsekstraksjon av Tmem27 med immuniserte magnetkuler. Nettsøk tyder også på at det ikke finnes kommersielt tilgjengelige magnetkuler koblet med Tmem27 antistoff. Sammensetningen av metoden for immunoaffinitetsekstraksjon ble besluttet ut ifra Life Technologies sin manual for Dynabeads, sammen med tidligere utviklede in-house metoder (5, 39, 46).

Metoden ble testet på 1 mL serum spiket med fullengde standard Tmem27-GST til 1 µg/mL. Etter ekstraksjonen ble ekstraktet fortynnet med 100 µL trypsineringsløsning (ABC, DTT, IAA, trypsin), til en konsentrasjon på maksimalt 1 µg/100 µL (= 10 µg/mL). 20 µL (Maksimalt 0,2 µg = 200ng) ble injisert i autosampler på trippelkvadrupol, og ga disse resultatene:



Figur 24 Immunoaffinitetsekstraksjon som viser T5 til venstre, og T14 til høyre.

Resultatene viser at standarden Tmem27-GST er detektert, både bevist av T5 og T14. Dette betyr også at både kobling av antistoff til magnetkuler, og immunoaffinitetsekstraksjon, var vellykket.

## 5.9 Valg av standard

### 5.9.1 Valg av standard for Tmem27

Etter den første optimaliseringen av MRM og den initielle testen av immunoaffinitetsekstraksjon av Tmem-GST viste flere av prøvekjøringene lite tilfredsstillende resultater. Etter overgang fra MS-systemet på ionefelle til trippelkvadrupol, eller fra standard Tmem27-IgG til Tmem27-GST. I noen tilfeller kan det se ut til at peptidene ikke er tilstede, selv ved konsentrasjoner og innstilligner som har vist gode resultater tidligere. Dette kan skyldes en rekke faktorer, som at man har glemt å tilsette standarden; gjort feil under fortynning av prøveløsningen, og injisert lavere konsentrasjon enn metoden klarer å detektere; forurensing av kolonna; degradering av standarden; mangelfull trypsinering, eller andre faktorer.

Vi kontrollerte at MS-systemet og kolonna fungerte tilfredsstillende for andre prøver, laget nye mobilfaser og andre løsninger. Etter gjennomgangen, og fortsatt dårlige resultater, kom vi frem til at problemene kunne skyldes standardene.

Tmem27-IgG ble ved mottak aliquotert til 20  $\mu\text{L}$  á 500  $\mu\text{g/mL}$  i 10 eppendorfrør. De første forsøkene ble gjort på slike mengder, men etterhvert ble det brukt mindre mengder enn hele rør, slik at det likevel skjedde uaktsom tin-og-frys, som kan ha ført til degradering. Denne utelukkende ekstracellulære standarden ble erstattet av en med full lengde, og dermed er det ikke aktuelt å se nærmere på Tmem27-IgG. Så ikke stabilitetsproblemer ved denne.

Tmem27-GST ble ikke aliquotert ut ved mottak første gang, men ved andre mottak ble den aliquotert under så mørke forhold som mulig, i små mengder på 10-20  $\mu\text{L}$ , og frosset ned til videre bruk. Brukte jeg andre batchen? Forklar det som to batcher som ble forskjellig behandlet, heller enn mottak Etterhvert ble vi oppmerksomme på at Tmem27-GST blant annet inneholder store mengder glutatation, som kan være inhiberende for den proteolytiske aktiviteten til trypsin (47).

Alternativene kan være å finne en standard som ikke inneholder glutatation, eller bytte trypsin med en annen proteolytisk substans.

## 5.10 Proteolytisk enzym

I denne oppgaven er det kun forsøkt med trypsin som proteolytisk substans. Som nevnt kan trypsin være uheldig i forbindelse med glutatationholdig standard, og kanskje er trypsin noe av problemet der man observerer missed cleavages, som hos T22+T23.

Et alternativ til trypsin, som kan gi lignende lengder på peptidene, kan være Lys C, som kløyver etter lysin. Lys C genererer færre peptider, men hele 8/12 er innenfor det ønskede området med 6-20 aminosyrer, mot 10/23 for trypsin, som i tillegg inneholder flere fremtredende missed cleavages (7). De tryptiske peptidene T5, T14 og T22/T23 gjenfinnes i lysinpeptidene L3, L7 og L12. L3 gjenspeiler T5 i sin helhet. L7 inneholder T14-sekvensen, i tillegg til T13. Det er en økning på bare to aminosyrer, så forhåpentligvis vil det ikke gi store, negative konsekvenser, selv om massene og m/z-verdiene endres. L12 er en sammenslåing av T22 og T23, som er det missed cleaved'e, intracellulære peptidet brukt som signaturpeptid for intakt Tmem27. Det vil være en fordel å utelukke den kløvingen som skjer med trypsin ved R218/L219, ettersom det er den missed cleaved-varianten man til nå har sett på.



Senere forsøk har vist dårlig stabilitet av standarden Tmem27-GST ved gjentatte tin/frys, som er den sannsynlige årsaken for varierende/fraværende resultater.

## 6 Konklusjon

Gjennom denne oppgaven er det utviklet en metode for kobling av Tmem27-antistoff til magnetiske kuler; det har blitt gjennomført immunoaffinitetsekstraksjon av standard for Tmem27 fra spiket serum, etterfulgt av enzymatisk spalting med trypsin; en MRM-metode for LC-MS/MS har blitt utviklet, og brukt til identifikasjon av både ekstracellulær og intakt Tmem27-standard.

Det ser ut til å være mulig å detektere både avspaltet, ekstracellulær Tmem27 og intakt Tmem27 ved hjelp av immunoaffinitets-LC-MS/MS.

Ekstracellulær Tmem27 kan påvises dersom man detekterer det tryptiske peptidet T5 ( $m/z = 825,7$ ), bekreftet med fragmentation b6 ( $m/z = 708,1$ ) eller y9 ( $m/z = 1158,6$ ), og samtidig ikke kan detektere intakt T14 og T22+T23.

Intakt Tmem27 kan påvises ved deteksjon av det tryptiske peptidet T14 ( $m/z = 964,3$ ), bekreftet med fragmentation y9 ( $m/z = 1108,1$ ) eller y11 ( $m/z = 1368,4$ ), eller det ukløyvede tryptiske peptidet T22+T23.

Før overføring til kliniske prøver bør metodens deteksjonsgrense i første omgang være innenfor kliniske verdier av Tmem27.

Ved å ta høyde for eventuelle posttranslatoriske modifikasjoner, som glykosylering, antar vi at metoden vil kunne overføres til in vivo Tmem27 i kliniske prøver.

## 7 Veien videre

Dette er bare starten av å utvikle Tmem27 som serummarkør for diabetes. Det første som bør gjøres videre er å fortsette optimaliseringen av metoden, for å komme ned i kliniske verdier av Tmem27. Deretter må metoden tilpasses kliniske prøver.

Optimalisering av den nåværende metoden:

Teste ny standard av Tmem27, og bruke Lys C som proteolytisk enzym.

Optimalisere mengden antistoff, magnetiske kuler, konsentrasjon av proteolytisk enzym og varighet av proteolyse, for å nå lavest mulig LOD. Analyser på QqQ med nanosystem er allerede i gang.

Evaluerer forholdet mellom intakt Tmem27 og ekstracellulært fragment, og bruke dette til å fastslå  $\beta$ -cellemasse og -skade.

# Litteraturliste

1. Pepaj M, Gjerlaugsen N, Julien K, Thorsby PM. Tmem27 is upregulated by vitamin D in INS-1 cells and its serum concentrations are low in patients with autoimmune diabetes. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 2014;74(4):358-65.
2. Helsedirektoratet. Diabetes Forebygging, diagnostikk og behandling. Nasjonale faglige retningslinjer. Oslo: Helsedirektoratet; 2009.
3. Akpinar P, Kuwajima S, Krützfeldt J, Stoffel M. Tmem27: A cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell Metabolism*. 2005;2(6):385-97.
4. Esterházy D, Stützer I, Wang H, Rechsteiner Markus P, Beauchamp J, Döbeli H, et al. Bace2 Is a  $\beta$  Cell-Enriched Protease that Regulates Pancreatic  $\beta$  Cell Function and Mass. *Cell Metabolism*. 2011;14(3):365-77.
5. Lund H, Løvstetten K, Paus E, Halvorsen TG, Reubsaet L. Immuno-MS Based Targeted Proteomics: Highly Specific, Sensitive, and Reproducible Human Chorionic Gonadotropin Determination for Clinical Diagnostics and Doping Analysis. *Analytical Chemistry*. 2012;84(18):7926-32.
6. Torsetnes SB, Nordlund MS, Paus E, Halvorsen TG, Reubsaet L. Digging Deeper into the Field of the Small Cell Lung Cancer Tumor Marker ProGRP: A Method for Differentiation of Its Isoforms. *Journal of Proteome Research*. 2013;12(1):412-20.
7. Liebler DC. Introduction to proteomics: tools for the new biology. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2002.
8. Alberts B, et al. *Essential Cell Biology*. 3rd ed. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2010.
9. Olsen JV, Ong S-E, Mann M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3(6):608-14.
10. Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46(8):1029-45.
11. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
12. World Health Organization DoNDS. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.
13. Stene LCS, Hanne; Gulseth, Hanne Lovdal. 2014 [updated 09.04.15; cited 2015 11.04.15]. Available from: <http://www.fhi.no/artikler/?id=110410>.
14. Stutzer I, Esterházy D, Stoffel M. The pancreatic beta cell surface proteome. *Diabetologia*. 2012;55(7):1877-89.
15. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998;15(7):539-53.
16. Lebastchi J, Herold KC. Immunologic and Metabolic Biomarkers of  $\beta$ -Cell Destruction in the Diagnosis of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2(6):a007708.

17. Rechsteiner MP, Floros X, Boehm BO, Marselli L, Marchetti P, Stoffel M, et al. Automated Assessment of  $\beta$ -Cell Area and Density per Islet and Patient Using TMEM27 and BACE2 Immunofluorescence Staining in Human Pancreatic  $\beta$ -Cells. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e98932.
18. Zhang H, Wada J, Hida K, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Shikata K, et al. Collectrin, a Collecting Duct-specific Transmembrane Glycoprotein, Is a Novel Homolog of ACE2 and Is Developmentally Regulated in Embryonic Kidneys. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(20):17132-9.
19. Stützer I, Selevsek N, Esterházy D, Schmidt A, Aebersold R, Stoffel M. Systematic Proteomic Analysis Identifies  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) Substrates in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(15):10536-47.
20. Esterházy D, Akpinar P, Stoffel M. Tmem27 dimerization, deglycosylation, plasma membrane depletion, and the extracellular Phe-Phe motif are negative regulators of cleavage by Bace2. 2012. p. 473.
21. Fukui K, Yang Q, Cao Y, Takahashi N, Hatakeyama H, Wang H, et al. The HNF-1 target Collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metabolism*. 2005;2(6):373-84.
22. Evensen SA. Serum Store medisinske leksikon2015 [cited 2015 23.03]. Available from: <https://sml.snl.no/serum>.
23. Torsetnes SB, Løvbak SG, Claus C, Lund H, Nordlund MS, Paus E, et al. Immunocapture and LC–MS/MS for selective quantification and differentiation of the isozymes of the biomarker neuron-specific enolase in serum. *Journal of Chromatography B*. 2013;929(0):125-32.
24. Yang W, Kernstock R, Simmons N, Alak A. ELISA microplate: a viable immunocapture platform over magnetic beads for immunoaffinity-LC–MS/MS quantitation of protein therapeutics? *Bioanalysis*. 2015;7(3):307-18.
25. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
26. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2009;11(1):49-79.
27. Aldrich S. Trypsin 2015 [cited 2015 02.05]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin.html>
28. Pedersen-Bjergaard SR, K.E. Legemiddelanalyse. 2 ed. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS; 2010.
29. Scientific TF. Overview of Mass Spectrometry 2015 [cited 2015 10.05]. Available from: <https://www.lifetechnologies.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html>.
30. Herrero P, Cortés-Francisco N, Borrull F, Caixach J, Pocurull E, Marcé RM. Comparison of triple quadrupole mass spectrometry and Orbitrap high-resolution mass spectrometry in ultrahigh performance liquid chromatography for the determination of veterinary drugs in sewage: benefits and drawbacks. *Journal of Mass Spectrometry*. 2014;49(7):585-96.
31. Scientific TF. LTQ Orbitrap XL 2015. Available from: <http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#.VYIIL3Y4WUK>.
32. Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, et al. Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*. 2006;78(7):2113-20.

33. Croker CG, Percy JO, Stahl DC, Moore RE, Keen DA, Lee TD. An expert virtual instrument approach to the automated, data dependent MS/MS and LC/MS/MS analysis of proteins. *Journal of biomolecular techniques* : JBT. 2000;11(3):135-41.
34. Schwartz JC, Senko MW, Syka JEP. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2002;13(6):659-69.
35. California TRotUo. ProteinProspector 2015 [cited 2015 21.02]. Available from: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>.
36. Information NCfB. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool 2015 [cited 2015 21.02]. Available from: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).
37. Lund H, Torsetnes SB, Paus E, Nustad K, Reubsæet L, Halvorsen TG. Exploring the Complementary Selectivity of Immunocapture and MS Detection for the Differentiation between hCG Isoforms in Clinically Relevant Samples. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(11):5241-52.
38. Paus E, Risberg T. Establishment and Evaluation of a Radioimmunoassay for Neuron-Specific Enolase. *Tumor Biology*. 1989;10(1):23-30.
39. Corporation LT. Dynabeads® M-280 Tosylactivated. Rev. 010 ed: Life Technologies Corporation; 2012.
40. Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bairoch A. UniProtKB/Swiss-Prot. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2007;406:89-112.
41. Information NCfB. Frequently Asked Questions BLAST 2015. Available from: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastDocs&DOC\\_TYPE=FAQ](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ).
42. Eng JK, McCormack AL, Yates Iii JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1994;5(11):976-89.
43. UniProtKB. Q9HBJ8 - TMM27\_HUMAN 2001 [updated 7. januar, 2015]. 93:[Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9HBJ8>.
44. van den Broek I, Romijn FPHTM, Smit NPM, van der Laarse A, Drijfhout JW, van der Burgt YEM, et al. Quantifying Protein Measurands by Peptide Measurements: Where Do Errors Arise? *Journal of Proteome Research*. 2015;14(2):928-42.
45. Torsetnes S, Broughton M, Paus E, Halvorsen T, Reubsæet L. Determining ProGRP and isoforms in lung and thyroid cancer patient samples: comparing an MS method with a routine clinical immunoassay. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(11):2733-8.
46. Torsetnes SB, Levernæs MS, Broughton MN, Paus E, Halvorsen TG, Reubsæet L. Multiplexing Determination of Small Cell Lung Cancer Biomarkers and Their Isovariants in Serum by Immunocapture LC-MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2014;86(14):6983-92.
47. Chauhan UP. Glutathione as an inhibitor of trypsin induced proteolysis. *Indian journal of experimental biology*. 1989;27(5):472-3.

# Vedlegg

Vedlegg Ia: Protein BLAST søkeinnstillinger

Vedlegg Ib: Protein BLAST søkeresultater

Vedlegg II: Proteome Discoverer Sequest HT Search Wizard søkeinnstillinger

Vedlegg IIIa: MS/MS-spektre av T5


Vedlegg IIIb: MS/MS-spektre av T9

Vedlegg IIIc: MS/MS-spektre av T10

Vedlegg IIId: MS/MS-spektre av T11

Vedlegg IV: Optimalisering av kollisjonsenergi for T5

## Vedlegg Ia: Protein BLAST søkeinnstillinger


 **BLAST®** *Basic Local Alignment Search Tool*

HomeRecent ResultsSaved StrategiesHelp

▸ NCBI/ BLAST/ blastp suite


blastnblastpblastxtblastntblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) 

Clear


INNAFFFLNDQTLEFLK

Query subrange 


From


To

Or, upload file

Browse... 


Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search 


☐ Align two or more sequences 


Choose Search Set

Database

UniProtKB/Swiss-Prot(swissprot) 

Organism   
 Optional


human (taxid:9606) ☐ Exclude 


Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown. 

Exclude   
 Optional

☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Entrez Query   
 Optional

 [Create custom database](#)

Enter an Entrez query to limit search 

Program Selection


Algorithm

☒ blastp (protein-protein BLAST)

☐ PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)

☐ PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)

☐ DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)

Choose a BLAST algorithm 


BLAST

Search database UniProtKB/Swiss-Prot(swissprot) using Blastp (protein-protein BLAST)


☐ Show results in a new window




## Vedlegg Ib: Protein BLAST søkeresultater

 Download	▼	<a href="#">GenPept</a>	<a href="#">Graphics</a>	Sort by: <span>E value</span> ▼
RecName: Full=Collectrin; AltName: Full=Transmembrane protein 27; Flags: Precursor Sequence ID: <a href="#">sp Q9HBJ8.1 TMM27_HUMAN</a> Length: 222 Number of Matches: 2				
Range 1: 112 to 127 <a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a> <span>▼ Next Match</span> <span>▲ Previous Match</span>				
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
55.8 bits(124)	6e-11	16/16(100%)	16/16(100%)	0/16(0%)
Query	1	INNAFFLNDQTLEFLK	16	
		INNAFFLNDQTLEFLK		
Sbjct	112	INNAFFLNDQTLEFLK	127	
Range 2: 208 to 212 <a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a> <span>▼ Next Match</span> <span>▲ Previous Match</span>				
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
17.2 bits(33)	518	4/5(80%)	5/5(100%)	0/5(0%)
Query	1	INNAF	5	
		IN+AF		
Sbjct	208	INDAF	212	

 Download	▼	<a href="#">GenPept</a>	<a href="#">Graphics</a>	Sort by: <span>E value</span> ▼
RecName: Full=Angiotensin-converting enzyme 2; AltName: Full=ACE-related converting enzyme 2; Flags: Precursor [Homo sapiens] Sequence ID: <a href="#">sp Q9BYF1.2 ACE2_HUMAN</a> Length: 805 Number of Matches: 1				
Range 1: 711 to 725 <a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a> <span>▼ Next Match</span> <span>▲ Previous Match</span>				
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
35.0 bits(75)	5e-04	11/15(73%)	12/15(80%)	0/15(0%)
Query	1	INNAFFLNDQTLEFL	15	
		IN+AF LND LEFL		
Sbjct	711	INDAFRLNDNSLEFL	725	

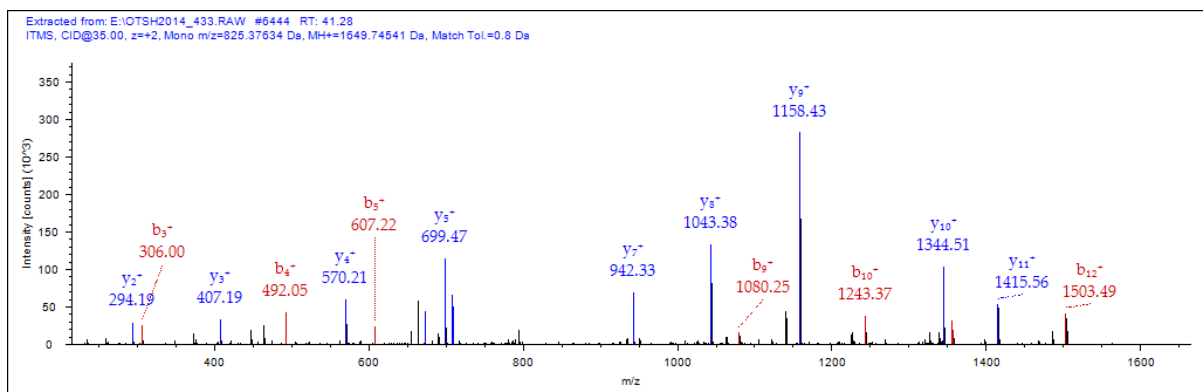
  

 Download	▼	<a href="#">GenPept</a>	<a href="#">Graphics</a>	Sort by: <span>E value</span> ▼
RecName: Full=Uncharacterized protein KIAA1467 [Homo sapiens] Sequence ID: <a href="#">sp A2RU67.1 K1467_HUMAN</a> Length: 622 Number of Matches: 2				
Range 1: 435 to 445 <a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a> <span>▼ Next Match</span> <span>▲ Previous Match</span>				
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
26.1 bits(54)	0.36	7/11(64%)	10/11(90%)	0/11(0%)
Query	5	FFLNDQTLEFL	15	
		+F +DQTL+FL		
Sbjct	435	YFTDDQTLDFL	445	
Range 2: 494 to 495 <a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a> <span>▼ Next Match</span> <span>▲ Previous Match</span>				
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
10.0 bits(16)	159990	2/2(100%)	2/2(100%)	0/2(0%)
Query	14	FL	15	
		FL		
Sbjct	494	FL	495	

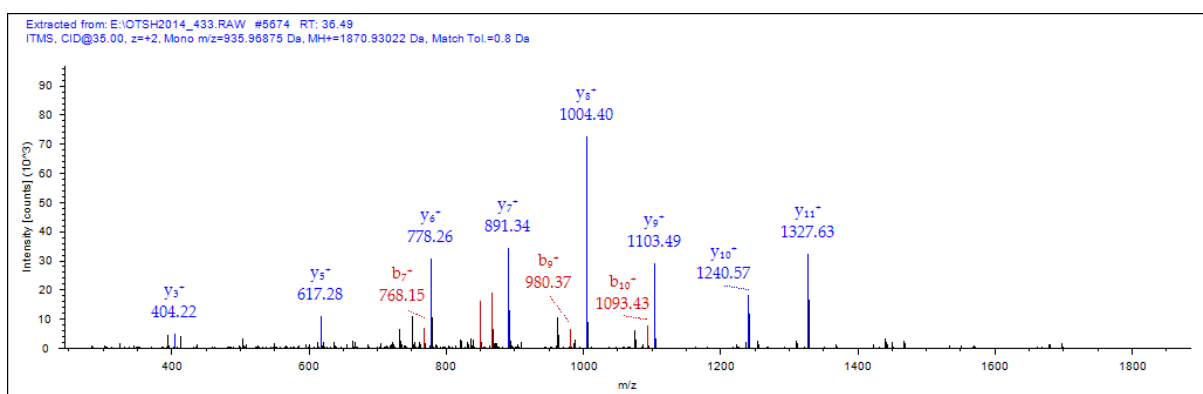
**Vedlegg II: Proteome Discoverer Sequest HT Search Wizard søkeinnstillinger**

Parameter	Verdi
First-last mass	200-5000
Da activation type	CID
Unrecognized charge replacements	Automatic
Intensity threshold	0
Minimum ion count	1
S/N	3
Database	TmemIgg.fasta
Enzyme	Trypsin, full
Missed cleavages	2
Precursor mass tolerance	10 ppm
Fragment mass tolerance	0,6 Da
$\beta$ -ions factor	1
y-ions factor	1
Dynamic side chain modifications	Oxidation M
Static side chain modifications	Carboxymethyl C

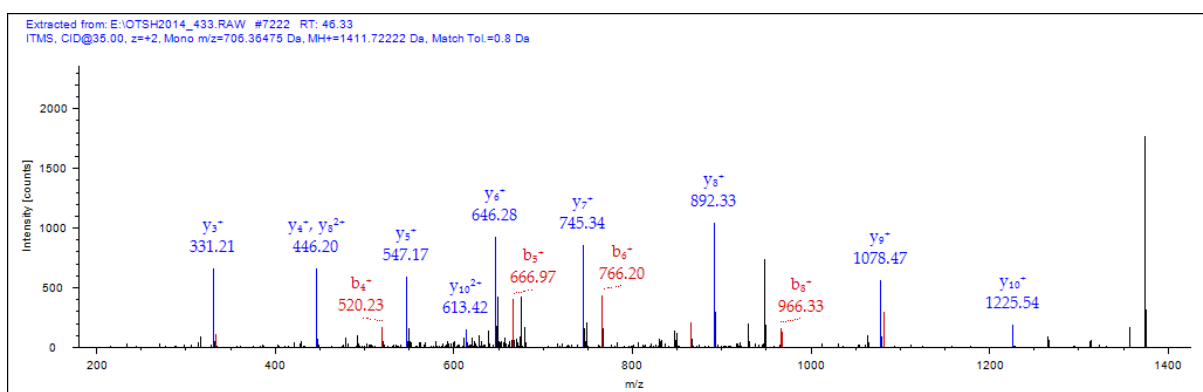
### Vedlegg IIIa: MS/MS-spektre av T5



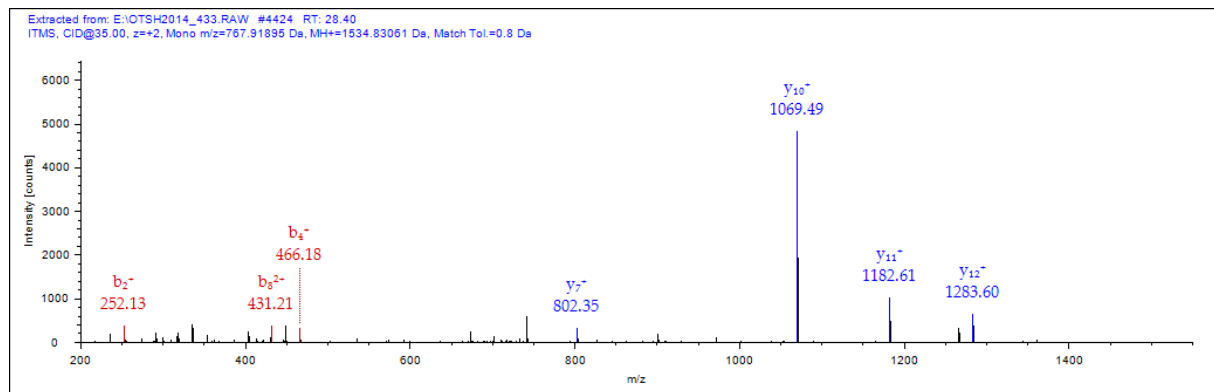
### Vedlegg IIIb: MS/MS-spektre av T9



### Vedlegg IIIc: MS/MS-spektre av T10



## Vedlegg IIId: MS/MS-spektre av T11



# Vedlegg IV: Optimalisering av kollisjonsenergi for T5

T5	Parent	Product MS1/MS2		Product MS1/MS2		Product MS1/MS2		Product MS1/MS2	
CID, eV	825,70	570,60		607,20		699,20		708,10	
18	850,00	13,76	95,78	19,93	57,95	14,73	98,05	29,53	66,37
20	1335,00	12,75	107,89	26,70	50,09	66,30	22,07	88,15	28,11
23	7190,00	123,00	60,44	85,30	85,32	149,00	48,32	662,50	10,85
25	7390,00	403,00	18,45	109,50	69,43	384,00	19,23	624,50	12,64
27	4340,00	107,50	39,81	30,70	152,09	185,05	53,64	189,55	26,22
30	2665,00	69,20	46,29	5,96	447,57	74,95	66,58	6,58	411,37
32	3875,00	193,50	19,47	14,85	269,30	58,20	75,87	5,74	729,56

Product MS1/MS2		Product MS1/MS2		Product MS1/MS2		Product MS1/MS2		Product MS1/MS2	
942,50		1043,50		1080,40		1158,60		1344,63	
12,23	138,93	12,99	108,23	9,27	146,95	101,95	19,70	9,57	117,48
19,55	68,36	42,10	33,05	7,39	209,70	156,75	10,09	45,10	51,80
100,30	99,07	373,50	19,43	6,65	1143,91	787,50	10,49	267,00	31,69
236,50	41,37	305,00	26,13	9,02	827,81	1494,50	7,63	323,00	24,80
101,45	47,76	221,50	19,31	8,16	524,31	464,00	9,50	135,70	36,51
73,65	56,58	148,30	21,64	4,48	603,38	327,00	9,52	123,60	27,05
34,91	181,52	197,00	20,05	4,17	911,97	379,00	9,74	96,70	51,06

Product MS1/MS2	
1415,80	
11,80	124,01
42,70	31,79
153,00	49,88
204,50	44,00
119,15	51,81
76,90	38,36
35,05	106,10